



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/54, C12P 21/02, C12N 9/10, 1/21, 5/14, 5/16, C12Q 1/68, C12N 15/63, A01K 67/027, G01N 33/15, 33/50, 33/574, A01H 5/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/50608</p> <p>(43) 国際公開日 2000年8月31日(31.08.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01070</p> <p>(22) 国際出願日 2000年2月24日(24.02.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/47571 1999年2月25日(25.02.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 成松 久(NARIMATSU, Hisashi)[JP/JP] 〒207-0013 東京都東大和市向原5-1082-1 Tokyo, (JP) 一色聡一郎(ISSHIKI, Soichiro)[JP/JP] 〒164-0011 東京都中野区中央1-30-2-101 Tokyo, (JP) 樽谷内品(TOGAYACHI, Akira)[JP/JP] 〒203-0043 東京都東久留米市下里1-11-42 Tokyo, (JP) 佐々木克敏(SASAKI, Katsutoshi)[JP/JP] 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料 の寄託に関する表示。</p>
<p>(54)Title: NOVEL POLYPEPTIDE</p> <p>(54)発明の名称 新規ポリペプチド</p> <p>(57) Abstract A novel polypeptide having a <math>\beta</math>1, 3-galactose transferase activity participating in the synthesis of type 1 sugar chains; a DNA encoding this polypeptide; a recombinant vector containing this DNA; a transformant having this recombinant vector; a process for producing a sugar chain-complex carbohydrate containing the above polypeptide or a type 1 sugar chain by using the above polypeptide or the above transformant; an antibody recognizing the polypeptide; a method for detecting and quantitating the polypeptide by using this antibody; a method for screening a substance relating to the polypeptide; a method for diagnosing and treating digestive cancer by using the DNA or the antibody; and a method for treating digestive cancer by using a substance obtained by the above screening method.</p>		

本発明によれば、タイプ1糖鎖の合成に関与する $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含有する組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドまたは該形質転換体を用いた該ポリペプチドまたはタイプ1糖鎖含有糖鎖・複合糖質の製

造法、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる該ポリペプチドの検出・定量法、該ポリペプチドに関わる物質のスクリーニング法、該DNAあるいは該抗体を用いた消化器系癌の診断法・治療法、スクリーニング法で得られた物質を用いた消化器系癌の治療法を提供することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュー・ジーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

### 新規ポリペプチド

#### 技術分野

本発明は、シアリルルイス a 糖鎖を発現している大腸癌細胞、膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイス a 糖鎖等のタイプ 1 糖鎖の合成に関与する  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA が組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該ポリペプチドを用いたタイプ 1 糖鎖含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該組換え体ベクターを保有する形質転換体を用いたタイプ 1 糖鎖含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法に関する。

#### 背景技術

糖鎖は、発生・分化、細胞認識といった生命現象に関与しているほか、炎症、癌、感染症、自己免疫疾患、およびその他多くの病気の発生、進行に深く関係していると考えられている〔木幡陽・箱守仙一郎・永井克孝編，グリコバイオリジーシリーズ①～⑥，講談社，（1993年）、Glycobiology, 3, 97 (1993)〕。

糖鎖は、タンパク質や脂質に付加して、糖タンパク質、プロテオグリカン、または糖脂質として存在するほか、オリゴ糖としても存在する。

Gal  $\beta$  1-3GlcNAc 構造を有する糖鎖はタイプ 1 糖鎖と呼ばれ、ルイス式血液型抗原や癌関連糖鎖抗原の骨格糖鎖を構成している。ルイス式血液型抗原としては、ルイス a 糖鎖 (Gal  $\beta$  1-3(Fuc  $\alpha$  1-4)GlcNAc) およびルイス b 糖鎖 [Fuc  $\alpha$  1-2Gal  $\beta$  1-3(Fuc  $\alpha$  1-4)GlcNAc] が存在する。シアリルルイス a 糖鎖 [NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3(Fuc  $\alpha$  1-4)GlcNAc] およびシアリルルイス c 糖鎖 (NeuAc  $\alpha$  2-3Gal  $\beta$  1-3GlcNAc) は、主に大腸癌や膵臓癌等の消化器系の癌において高頻度に検出される癌関連糖鎖であり、シアリルルイス a 糖鎖およびシアリルルイス c 糖鎖

に対する抗体は癌の血清診断に利用されている。

白血球の炎症部位への集積やリンパ球のリンパ節へのホーミングには、接着分子セレクトイン (E-, P-, およびL-セレクトイン) とその糖鎖リガンド (シアリルルイスx糖鎖またはその関連糖鎖) の接着が関与していることが明らかとなっている。

シアリルルイスx糖鎖 [NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc] の構造異性体であるシアリルルイスa糖鎖はセレクトインと結合することから、シアリルルイスa糖鎖は癌の転移に関与すると考えられている。また、大腸癌や膵臓癌におけるシアリルルイスa糖鎖の発現量が、癌の予後の悪さと相関しているという報告もある。

Gal $\beta$ 1-3GlcNAc構造は、GlcNAc $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素によって合成される。これまでに3種類のGlcNAc $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素 ( $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2、 $\beta$ 3Gal-T3) の遺伝子がクローン化され、それぞれの酵素の受容基質特異性が解析されている〔特開平6-181759、J. Biol. Chem., 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem., 273, 433-440(1998)、J. Biol. Chem., 273, 12770-12778 (1998)〕。また、基質特異性の異なる別の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素( $\beta$ 3Gal-T4)の遺伝子がクローン化されている〔J. Biol. Chem., 272, 24794-24799 (1997)、J. Biol. Chem., 273, 12770-12778 (1998)〕。 $\beta$ 3Gal-T4はガングリオシドGA1、GM1またはGD1bを合成するが、Gal $\beta$ 1-3GlcNAc構造は合成しない。

大腸癌や膵臓癌等の消化器系の癌において、癌関連糖鎖であるシアリルルイスa糖鎖およびシアリルルイスc糖鎖の合成に関与するGlcNAc $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素が同定できれば、該酵素または該酵素遺伝子の発現量を調べることにより、より正確な癌の診断が可能になると推定される。また、該酵素活性、または該酵素遺伝子の転写・翻訳を抑制することにより、癌転移の抑制が可能になると期待される。しかし、これまでに該酵素または該酵素遺伝子は同定されていない。大腸癌細胞株Colo205からGlcNAc $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵



素が部分精製されているが、該酵素の単離、該酵素のアミノ酸配列の決定、ならびに該酵素遺伝子の単離には至っていない〔J. Biol. Chem., 262, 15649-15658 (1987)、Archi. Biochem. Biophys. 270, 630-646 (1989)、Archi. Biochem. Biophys. 274, 14-25 (1989)〕。

セレクトインに強い結合能を有する糖鎖は、セレクトインアンタゴニストとして、炎症や癌転移の治療および予防に有用である。従って、大腸癌や膵臓癌等の消化器系の癌においてシアリルルイス a 糖鎖の合成に関与している  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素は、セレクトインアンタゴニストの効率的合成にも利用可能と推定される。

ヒトの乳中には、様々なオリゴ糖が存在することが知られている〔Acta Paediatrica, 82, 903 (1993)〕。ラクトーN-テトラオース (Gal  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$  1-3GlcNAc  $\beta$  1-4Glc) は、ヒト乳中に多く含まれ、乳児がウイルスや微生物に感染するのを防いでいると考えられている。また、ラクトーN-テトラオースには良性の腸内細菌であるビフィズス菌の増殖を促す活性もある。一方、ウシやマウス等の動物の乳中に存在するオリゴ糖の種類は少なく、大部分がラクトースであり3糖以上のオリゴ糖はほとんど存在しない〔Acta Paediatrica, 82, 903 (1993)、J. Biol. Chem., 270, 29515 (1995)〕。

ラクトーN-テトラオースを母核とする様々なオリゴ糖、あるいはそれらが含まれたミルクを効率よく生産することができれば、産業上非常に有用と思われる。したがって、これまでにクローン化されたGlcNAc  $\beta$  1,3-ガラクトース転移酵素に比較して、ラクトーN-テトラオースを合成する活性のより高い酵素の開発は産業上重要な課題である。

#### 発明の開示

本発明は、新規な  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素を有するポリペプチドを利用し、抗炎症、抗感染症、または癌転移抑制等の医薬品、乳製品等の食品、タンパク質の改善法、および癌等の疾患の診断法を提供することを目的とする。

本発明は、以下の(1)～(47)に関する。

(1) シアリルルイスa糖鎖を発現している大腸癌細胞に存在する、シアリルルイスa糖鎖の合成に関与する $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド。

上記本発明の新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、シアリルルイスa糖鎖を発現している大腸癌細胞のみならずシアリルルイスc糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖等のタイプ1糖鎖を発現している大腸癌細胞、膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞にも存在する。また、これら消化器系癌細胞に存在するタイプ1糖鎖の効率的合成に関与する $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドも、本発明のポリペプチドである。本発明のポリペプチドは、公知の $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2および $\beta$ 3Gal-T3とは異なる新規な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素である。

(2) 以下の(a)、(b)および(c)からなる群より選ばれるポリペプチド：

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列の31～310番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および

(c) (a)または(b)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成可能な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド。

上記(a)または(b)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ該ポリペプチドの有するGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成可能な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular

Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、1個から数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

また、本発明のポリペプチドがGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成可能な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するためには、配列番号1記載のアミノ酸配列と、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63-98 (1990)] 等を用いて計算したときに(相同性の%を定義するための計算手段・方法等を記載する)、少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

上記の(a)または(b)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成可能な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、公知の $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2および $\beta$ 3Gal-T3とは異なる新規な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素である。

(3)  $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースを転移する活性である上記(1)または(2)記載のポリペプチド。

(4)  $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性が、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glcの非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基、またはN-アセチル

グルコサミン単糖に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースを転移する活性である、上記(1)または(2)記載のポリペプチド。

(5) 以下の(a)、(b)、(c)および(d)からなる群より選ばれるDNA:

(a) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNA、

(b) 配列番号2で表される塩基配列の402～1331番目の塩基配列を有するDNA、

(c) 配列番号2で表される塩基配列の492～1331番目の塩基配列を有するDNA、および

(d) (a)～(c)いずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成可能な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

上記の「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、上記(a)、(b)および(c)のDNAからなる群より選ばれるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0 mol/lのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液(1倍濃度のSSC溶液の組成は、150 mmol/l 塩化ナトリウム、15 mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる)を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント1～38、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford

University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] やFASTA [Methods in Enzymology, 183, 63-98 (1990)] 等を用いて計算したときに（相同性の％を定義するための計算手段・方法等を記載する）、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAの塩基配列と少なくとも60％以上の相同性を有するDNA、好ましくは80％以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95％以上の相同性を有するDNAをあげることができる。該DNAのコードするGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成可能な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドは、公知の $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2および $\beta$ 3Gal-T3とは異なる新規な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素である。

(6) 上記(5)記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(7) 組換え体DNAが、プラスミドpAMo-3GT5またはプラスミドpBS-3GT5 (FERM BP-6645)である、上記(6)記載の組換え体DNA。

(8) 上記(5)に記載のDNA、(6)記載の組換え体DNA、または(7)記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(9) 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物からなる群より選ばれる形質転換体である、上記(8)記載の形質転換体。

(10) 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、上記(9)記載の形質転換体。

(11) 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞

胞から選ばれる動物細胞である、上記（９）記載の形質転換体。

（１２） 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞およびカイコの卵巣細胞からなる群より選ばれる昆虫細胞である、上記（９）記載の形質転換体。

（１３） 上記（１）～（４）のいずれか１つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

（１４） 上記（１）～（４）のいずれか１つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

（１５） 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記（１４）記載の製造法。

（１６） 上記（１）～（４）のいずれか１つに記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

（１７） 上記（１）～（４）のいずれか１つに記載のポリペプチドをコードするDNAを用い、in vitroでの転写・翻訳系により該ポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

（１８） 上記（１）～（４）のいずれか１つに記載のポリペプチドを酵素源として用い、

（a）該酵素源、

(b) i) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、  
ii) N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖および  
iii) N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有する複合糖質から選ばれる受容基質、および  
(c) ウリジン-5'-二リン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミン残基に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

(19) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、  
(b) i) グルコース、  
ii) グルコース残基を非還元末端に有するオリゴ糖および  
iii) グルコース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質からなる群より選ばれる受容基質、および  
(c) ウリジン-5'-二リン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のグルコースまたはグルコース残基に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

(20) 上記(9)記載の微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体からなる群より選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

(21) 上記(9)記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

(22) 上記(9)記載のトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

(23) 複合糖質が、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リポ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物等に糖鎖が結合した配糖体からなる群より選ばれる複合糖質である、上記(18)～(22)のいずれか1つに記載の製造法。

(24) 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、上記(21)記載の製造法。

(25) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAを用い、ハイブリダイゼーション法により、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

(26) 上記(5)に記載のDNAまたは配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体から選ばれるDNA。

(27) オリゴヌクレオチド誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘



導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスファミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロビニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5 プロビニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2' - O-プロビルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体およびオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体からなる群より選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、上記(26)記載のオリゴヌクレオチド。

(28) 配列番号20または21で表される塩基配列を有するDNA。

(29) 上記(26)～(28)のいずれか1つに記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法により、上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

(30) 上記(25)または(29)記載の方法を用いた癌または癌転移の検出法。

(31) 上記(5)、(26)～(28)記載のDNAおよび配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNAから得られるDNAを用い、上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

(32) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドを認識する抗体。

(33) 上記(32)記載の抗体を用いる、上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

(34) 上記(32)記載の抗体を用い、上記(1)～(4)のいずれかに記載のポリペプチドを検出することを特徴とする免疫組織染色法。

(35) 上記(32)記載の抗体を含有する免疫組織染色剤。

(36) 上記(32)記載の抗体を含有する、癌または癌転移の診断薬。

(37) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

(38) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、抗シアリルルイスa抗体、抗ルイスa抗体、抗ルイスb抗体または抗シアリルルイスc抗体を用い、シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

(39) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、上記(32)記載の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

(40) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーターDNA。

(41) プロモーターDNAが、小腸細胞、大腸細胞、膵臓細胞、胃細胞、大腸癌細胞、膵癌細胞および胃癌細胞からなる群より選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、上記(40)記載のプロモーターDNA。

(42) プロモーターDNAが、ヒトまたはマウス由来のプロモーターDNAである、上記(40)または(41)記載のプロモーターDNA。

(43) プロモーターDNAが配列番号3で表される塩基配列の1～50

00番目の塩基配列中の連続する50～5000bpのDNA配列を有する、上記(40)～(42)のいずれか1つに記載のプロモーターDNA。

(44) 上記(40)～(43)のいずれか1つに記載のプロモーターDNAおよび該プロモーターDNAの下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物含量を測定することを特徴とする、該プロモータによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

(45) レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、上記(44)記載のスクリーニング法。

(46) 上記(1)～(4)のいずれか1つに記載のポリペプチドをコードするDNAを欠損または変異させたノックアウト動物。

(47) ノックアウト動物がマウスである、上記(46)記載のノックアウト動物。

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のシアリルルイスa糖鎖等のタイプ1糖鎖を合成可能な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチドをコードするDNA(以下、新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子と略すこともある)の取得、ならびに該DNAおよびオリゴヌクレオチドの製造

シアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖を発現している、大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞より、常法によりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント1～38、A Laboratory Manual, 2nd Ed.(1989)、DNA Cloning 1.0

Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング〔SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製〕やザップー cDNA・シンセシス・キット〔ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製〕を用いる方法等があげられる。

シアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖を発現している大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞としては、例えば、シアリルルイス a 糖鎖を発現しているヒト大腸癌細胞株である Colo205、Colo201、SW1116等、あるいはシアリルルイス a 糖鎖を発現しているヒト膵臓癌細胞株である Capan-2 等を用いることができる。

cDNAライブラリーを作製するための、クローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express〔ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)〕、pBluescript II SK(+)〔Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)〕、λZAP II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11〔DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)〕、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2〔Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)〕、pUC18〔Gene, 33, 103 (1985)〕、pAMo〔J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名 pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)〕等をあげることができる。

宿主微生物としては、大腸菌 Escherichia coli に属する微生物であればいずれでも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF'〔ストラタジーン社製、Strategies, 5, 81 (1992)〕、Escherichia coli C600〔Genetics, 39, 440 (1954)〕、Escherichia coli Y1088〔Science, 222, 778 (1983)〕、

Escherichia coli Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLR™ Strain [ストラタジーン社より市販]、E. coli LE392 (モレキュラー・クローニング第2版) 等を用いることができる。

cDNAライブラリーとして、例えば、以下のようにして作製したcDNAライブラリーをあげることができる。

ヒト大腸癌細胞株Colo205由来のmRNAよりGIBCO BRL社製のcDNA合成システム (cDNA Synthesis System) キットを用いてcDNAを合成する。

該DNAの両末端にSfiIリンカーを付与した後、クローニングベクターpAMoのSfiI部位に挿入したプラスミドを作製する。

該プラスミドを用い、E. coli LE392を形質転換してcDNAライブラリーを作製する。

作製したcDNAライブラリーより目的とするDNAを含むクローンを以下の方法で選択する。

上記で作製したcDNAライブラリーから、常法あるいはキアジェン (Qiagen) 社製のプラスミド調製キットである/plasmid/maxi kit (商品番号41031) 等のキットを用いてプラスミドを調製する。

既知の4種の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列を比較することにより、4種の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素でアミノ酸配列がよく保存されている領域を2ヶ所以上見出す。

公知の方法 [Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksler, "PCR Primer: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Lab. (1995)、井上純一郎・仙波憲太郎編, ザ・プロトコールシリーズ「cDNAクローニング」, 羊土社, (1996年)、Science, 241, 42 (1988)] に従って各領域のアミノ酸配列に対応するDNA配列を有するdegenerateプライマーを設計し、上記で調製したcDNAライブラリーを鋳型としてポリメラーゼ・チェーン・リアクション (Polymerase

Chain Reaction ; 以下、PCRと略記する) [モレキュラー・クローニング第2版およびPCR Protocols Academic Press (1990)] を行い、増幅断片を適当なプラスミドにサブクローニングする。

PCR増幅断片のサブクローニングは、増幅DNA断片をそのまま、あるいは制限酵素やDNAポリメラーゼで処理後、常法によりベクターに組み込むことにより行うことができる。

ベクターとしては、pBluescript II SK(+), pBluescript SK(-) (いずれもStratagene社製)、pDIRECT [Nucleic Acids Research, 18, 6069 (1990)]、pCR-Script Amp SK(+) [Stratagene社製、Strategies, 5, 6264 (1992)]、pT7Blue [Novagen社製]、pCR II [インビトロジェン社製、Biotechnology, 9, 657 (1991)]、pCR-TRAP [Genhunter社製]、pNotA<sub>T7</sub> (5' → 3' 社製) 等をあげることができる。

サブクローン化されたPCR増幅断片の塩基配列を決定することにより、既知の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列とホモロジーを有するが完全には一致しないアミノ酸配列をコードするDNA断片を選択する。塩基配列は、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいは373A-DNAシーケンサー [Perkin Elmer社製] 等の塩基配列分析装置を用いて決定することができる。

上記で作製したcDNAライブラリーに対して、該DNA断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第2版) を行うことにより、既知の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素とホモロジーを有するポリペプチドをコードするcDNAを取得することができる。プローブとしては、該DNA断片をアイソトープあるいはジゴキシゲニン (digoxigenin) 標識したものを使用することができる。

上記の方法により取得されたDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後、モレキュラー・クローニング第2版等に

記載の常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー(Sanger)らのジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)〕あるいは373A・DNAシーケンサー〔パーキン・エルマー(Perkin Elmer)社製〕等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。

該方法により取得されるDNAとして、例えば、配列番号1で表されるポリペプチドをコードするDNA等をあげることができ、具体的には、配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号2のDNAを含むプラスミドとしては、例えば、後述の実施例に記載したpAMo-3GT5、pBS-3GT5 (FERM BP-6645)をあげることができる。

上記のようにして取得したDNAを発現ベクターに組み込み、発現プラスミドを構築する。得られた発現プラスミドを適当な動物細胞に導入後、抗シアリルルイスa糖鎖抗体または抗シアリルルイスc糖鎖抗体を用いたフルオレッセンス・アクティベータッド・セル・ソーター (Fluorescence Activated Cell Sorter; 以下、FACSと略記する) 解析により、該DNAがシアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖の合成に関与する $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素をコードするかどうかを調べることができる。

該発現ベクターとしては、該cDNAを組み込んで動物細胞で発現できるベクターであればいかなるものでも用いることができ、例えば、pcDNA1/Amp、pcDNA1、pCDM8 (いずれもフナコシ社より市販)、pAGE107〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、pAMo、pAMoA〔J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRSA (特開平05-336963)〕、pAS3-3 (特開平2-227075) 等を用いることができる。

cDNAを組み込んだ発現ベクターを、目的とするcDNAを選択可能な動物細胞に導入し、形質転換細胞を取得する。

該発現ベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法

〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等の方法をあげることができる。

動物細胞としては、ヒトの細胞であるNamalwa細胞、Namalwa細胞のサブラインであるNamalwa KJM-1細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、大腸癌細胞株であるHCT-15等をあげることができ、好ましくは、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞またはHCT-15をあげることができる。

得られた形質転換細胞を常法により培養する。

具体的には、以下の形質転換体の培養方法をあげることができる。

形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常pH 6～8、25～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

該培養により得られた細胞を、抗シアリルルイスa糖鎖抗体または抗シアリルルイスc糖鎖抗体を用いて蛍光染色した後、FACSを用いて解析することにより、該発現プラスミドを導入した細胞においてシアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖量が増加するかどうか検討する。シアリルルイスa糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖量が増加していれば、該DNAはシアリルルイスa



糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖の合成に関与する新規  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素をコードしていると考えることができる。

シアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖と反応する抗体であればいかなるものでも、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体または抗シアリルルイス c 糖鎖抗体として用いることができ、例えば、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体である 19-9 (Fujirebio社製)やKM231 (Kyowa Medex社製)、あるいは抗シアリルルイス c 糖鎖抗体であるDU-PAN-2 (Kyowa Medex社製) をあげることができる。

以上のようにして、大腸癌細胞、膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイス a 糖鎖等のタイプ 1 糖鎖に属する癌関連糖鎖の合成に関与する、 $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチドをコードする DNA を取得することができる。

また、上記方法で取得した DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA を選択することにより、配列番号 1 記載のアミノ酸配列と比較して、1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする目的の DNA を取得することができる。

即ち、非ヒト動物、例えば、マウス、ラット、ウシ、サル等由来の cDNA ライブラリーに対してスクリーニングを行うことにより、目的の DNA を取得することができる。

決定された新規  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、該ポリペプチドをコードする DNA を化学合成することによっても目的の DNA を調製することができる。DNA の化学合成は、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製の DNA 合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製の DNA 合成機 model 392 等を用いて行うことができる。

また、後述のオリゴヌクレオチドをセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用い、これら DNA に相補的な mRNA を発現している細胞の mRNA から調製した cDNA を鋳型として、PCR を行うことによっても、

目的とするDNAを調製することができる。

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、モレキュラー・クローニング第2版等に記載の常法、あるいはDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号2または3で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度（ $T_m$ ）および塩基数が極端に変わることはない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。具体的には、配列番号20，21等を示された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをあげることができる。

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3'－P5'ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC－5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC－5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC－5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチ

ド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

(2) 新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素ポリペプチド (以下、本発明のポリペプチドともいう) の製造

本発明のポリペプチドは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サプリメント1~38等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、本発明のDNAを宿主細胞中で発現させ、製造することができる。

本発明のポリペプチドをコードする全長DNAを基にして、必要に応じて、該ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。

また、該ポリペプチドをコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換したDNAを調製する。該DNAは該ポリペプチドの生産率を向上させるうえで有用である。

該DNA断片、または全長DNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体DNA (組換えベクター) を作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の転写に適した位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に

に、プロモーター、リボソーム結合配列、新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもペーリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2 (ファルマシア社)、pSE280 (インビトロジェン社)、pGEMEX-1〔プロメガ(Promega)社製〕、pQE-8(キアゲン(QIAGEN)社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK+ (ストラタジーン社製)、pBluescript II SK(-) (ストラタジーン社製)、pTrs30 (FERM BP-5407)、pTrs32(FERM BP-5408)、pGHA2(FERM BP-400)、pGKA2(FERM B-6798)、pTerm2 (特開平3-22979、US4686191、US4939094、US5160735)、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (ファルマシア社製)、pETシステム (ノバジェン社製)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pTrxFus (Invitrogen社製)、pMAL-c2 (New England Biolabs社製)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28 (宝酒造社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pPA1 (特開昭63-233798) 等を例示することができる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (P trp)、lacプロモーター (P lac)、P<sub>L</sub>プロモーター、P<sub>R</sub>プロモーター、P<sub>SE</sub>プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またP trpを2つ直列させたプロモーター (P trp x 2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、letIプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを

用いることが好ましい。

本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli BL21(DE3)、Escherichia coli BL21(DE3)pLysS、Escherichia coli HMS174(DE3)、Escherichia coli HMS174(DE3)pLysS、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法

[Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]、カルシウムイオンを用いる方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法(特開昭63-248394)、Gene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YEp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF $\alpha$ 1プロモーター、CUP 1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピチア属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Pichia pastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163(1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNAI/Amp、pcDNAI、pCDM8 (いずれもフナコシ社より市販)、pAGE107 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pREP4 (インビトロジェン社製)、pAGE103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、pAMo、pAMoA [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRSA (特開平05-336963)]、pAS3-3 (特開平2-227075)等を例示することができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (ヒトCMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、モロニー・ミュリン・ロイケミア・ウイルス (Moloney Murine Leukemia Virus) のロング・ターミナル・リピート・プロモーター (Long Terminal Repeat Promoter)、レト

ロウウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、あるいはメタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒトの細胞であるNamalwa細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637（特開昭63-299）、ヒト大腸癌細胞株等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293(ATCC: CRL-1573)等、ヒト白血病細胞としてはBALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法

〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕、Virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕、モレキュラー・バイオロジー ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Biology, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サブルメント 1～38 (Current Protocols in Molecular Biology)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルス

を昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（すべてインビトロジェン社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞、Trichoplusia niの卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞としてはSf9、Sf21（バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル）等、Trichoplusia niの卵巣細胞としてはHigh 5、BTI-TN-5B1-4（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはBombyx mori N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法〔組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)〕に準じてポリペプチドを生産することができる。



発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。また、プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率をあげることもできる。

宿主細胞としては、ポテト、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、ニンジン、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 (特開昭60-251887)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等をあげることができる。

遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。

培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ (MS) 培地、ホワイト (White) 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 5～9、20～40℃の条件下で3～60日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体 (トランスジェニック植物) を造成することもできる。

動物個体を用いて本発明のポリペプチドを生産することもできる。例えば、

公知の方法〔American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S (1996)、American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)〕に準じて、遺伝子を導入した動物中に本発明のポリペプチドを生産することができる。

プロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである $\alpha$ カゼインプロモーター、 $\beta$ カゼインプロモーター、 $\beta$ ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

本発明のポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ポリペプチドを生成・蓄積させ、該培養物より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ポリペプチドを生成・蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ポリペプチドを採取することにより、該ポリペプチドを製造することができる。

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該組換え体DNAのコードする新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

植物個体の場合、例えば、本発明のDNAを保有するトランスジェニック植物を栽培し、該組換え体DNAのコードする新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドを該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することにより、新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドを製造することができる。

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら本発明の形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成・蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。

培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。

培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を

培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地〔The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)〕またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常pH 6～8、25～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。

また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

本発明のポリペプチド製造用形質転換体が昆虫細胞である場合、該細胞を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地（ファーマンジェン社製）、Sf-900 II SFM培地（ギブコBRL社製）、ExCell 400、ExCell 405〔いずれもJRHバイオサイエンシーズ社製〕、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

培養は、通常pH 6～7、25～30℃等の条件下で、1～5日間行う。

また、培養中に必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

遺伝子の発現方法としては、ポリペプチド全長を発現させる以外に、β1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する領域を含む部分ポリペプチドとして発

現させることもできる。糖転移酵素は、一般にタイプ2型の膜タンパク質のトポロジーを有し、N末端の数から数十アミノ酸からなる細胞質領域、疎水性の高いアミノ酸配列を有する膜結合領域、数から数十アミノ酸からなる幹領域 (stem region)、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなっている。幹領域と触媒領域を含む残りの大半のC末端部分は、ゴルジ体内腔に露出していると考えられる。幹領域と触媒領域の境界は、N末端を欠失させたポリペプチドを作製し、どこまで欠失させると活性がなくなるかを検討することにより、実験的に求めることができる。一方、幹領域と触媒領域に関する知見のある類似の糖転移酵素とアミノ酸配列を比較することにより、幹領域と触媒領域を予想することもできる。

本発明の新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素の構造も、他の糖転移酵素と同様の構造を有している。

例えば、配列番号1で示されたアミノ酸配列を有する本発明のポリペプチドの場合、N末端の7アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く19アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも4アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなる。他の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見〔特開平6-181759〕を基に、幹領域は少なくとも4アミノ酸からなると予想される。従って、31番目から310番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

上記のポリペプチド全長または $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する領域 (触媒領域) を含む部分ポリペプチドは、直接発現させる以外に、モレキュラー・クローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ(Arg)、

ポリ (G l u)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、Sペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、T a c 抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、および任意の抗体のエピトープ等があげられる〔山川彰夫、実験医学、13, 469-474 (1995)〕。

本発明のポリペプチドの生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるポリペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

本発明のポリペプチドが宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ボールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平05-336963、W094/23021等に記載の方法を準用することにより、該ポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明のポリペプチドの活性部位を含むポリペプチドの手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

具体的には、触媒部位を含むと考えられる31番目から310番目までのアミノ酸配列を有するポリペプチドの手前に、シグナルペプチドを付加して発現させることにより、本発明のポリペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができると考えられる。さらに、シグナルペプチドと触媒領域を含むポリペプチドの間、または触媒領域を含むポリペプチドのC末端に、精製・検出用のタグを付加することもできる。精製・検出用のタグとしては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのI g G結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリ (A r g)、ポリ (G l u)、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポ

リヒスチジン鎖 (His-tag)、S ペプチド、DNA 結合タンパク質ドメイン、T a c 抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、および任意の抗体のエピトープ等があげられる〔山川彰夫，実験医学，13，469-474 (1995)〕。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

本発明ポリペプチド製造用形質転換体の培養物から、本発明のポリペプチドを単離・精製するには、通常の酵素の単離・精製法を用いることができる。

例えば、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチド製造用形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後に、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (D E A E) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体をポリペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を、ポリペプチド変性剤を含まないあるいはポリペプチド変性剤の濃度がポリペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に

希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

細胞外に該ポリペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上清からの単離精製法と同様の手法により、該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

また、通常の糖転移酵素の精製方法〔Methods in Enzymology, 83, 458〕に準じて精製できる。

また、本発明のポリペプチドを他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる〔山川彰夫, 実験医学, 13, 469-474 (1995)〕。

例えば、ロウらの方法〔Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、W094/23021に記載の方法に準じて、本発明のポリペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

また、本発明のポリペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗FLAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕。

更に、該ポリペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

本発明のポリペプチドは、公知の方法〔J. Biomolecular NMR, 6, 129-134、Science, 242, 1162-1164、J.Biochem., 110, 166-168 (1991)〕に準じて、in vitro 転写・翻訳系を用いて生産することができる。

上記で取得されたポリペプチドのアミノ酸情報を基に、Fmoc法（フルオ



レニルメチルオキシカルボニル法)、t B o c法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても本発明のポリペプチドを製造することができる。また、アドバンスト・ケムテック(Advanced ChemTech)社、パーキン・エルマー社、ファルマシアバイオテック社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント(Protein Technology Instrument)社、シンセセル・ベガ(Synthecell-Vega)社、パーセプティブ(PerSeptive)社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

精製した本発明のポリペプチドの構造解析は、タンパク質化学で通常用いられる方法、例えば遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析(平野久著、東京化学同人発行、1993年)に記載の方法により実施可能である。

本発明のポリペプチドの $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性は、公知の測定法[J. Biol. Chem., 258, 9893-9898 (1983)、J. Biol. Chem., 262, 15649-15658 (1987)、Archi. Biochem. Biophys., 270, 630-646 (1989)、Archi. Biochem. Biophys., 274, 14-25 (1989)、特開平06-181759、J. Biol. Chem., 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem., 273, 433-440 (1998)、J. Biol. Chem., 273, 12770-12778 (1998)] に準じて測定することができる。

(3) ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合で、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造

上記(2)で取得した微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体からなる群より選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することにより、該糖鎖または該複合糖質を製造することができる。

ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン残基に付加した構

造を含有する糖鎖として、シアリルルイス a 構造を含有する糖鎖、シアリルルイス c 構造を含有する糖鎖、ルイス a 構造を含有する糖鎖、ルイス b 構造を含有する糖鎖、Gal  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$  1-3GlcNAc 構造を含有する糖鎖、Gal  $\alpha$  1-3(Fuc  $\alpha$  1-2)Gal  $\beta$  1-3GlcNAc 構造を含有する糖鎖、GalNAc  $\alpha$  1-3(Fuc  $\alpha$  1-2)Gal  $\beta$  1-3GlcNAc 構造を含有する糖鎖等をあげることができる。

培養は上記 (2) に準じて行うことができる。

上記形質転換体において、本発明のポリペプチドと任意の組換え糖タンパク質 (例えば医薬用組換え糖タンパク質) を、糖鎖合成可能な形質転換体中で同時に生産させることにより、該組換え糖タンパク質に、ガラクトースが  $\beta$  1, 3 結合で、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖を付加することができる。

また、上記 (2) で取得した動物個体または植物個体を用い、上記 (2) の方法に準じて、ガラクトースが  $\beta$  1, 3 結合で、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

即ち、動物個体の場合、例えば、本発明の DNA を保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、ガラクトースが  $\beta$  1, 3 結合で N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該生成物を採取することにより、ガラクトースが  $\beta$  1, 3 結合で N-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

植物個体の場合、例えば、本発明の DNA を保有するトランスジェニック植

物を栽培し、該植物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該生産物を採取することにより、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリヘプチドを酵素源として用い、水性媒体中で、糖鎖の非還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン残基またはN-アセチルグルコサミン単糖に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

即ち、N-アセチルグルコサミン単糖、N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖、またはN-アセチルグルコサミン残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質を受容基質として、上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリヘプチドを酵素源として用い、該受容基質、該酵素源およびウリジン-5'-二リン酸ガラクトース(UDP-Gal)を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のN-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルグルコサミン残基に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリヘプチドを酵素源として用い、水性媒体中で、糖鎖の非還元末端に存在するグルコース残基またはグルコース単糖に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を、以下の方法で製造することができる。

即ち、グルコース単糖、グルコース残基を非還元末端に有するオリゴ糖、またはグルコース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質を受容基質として、上記(2)記載の方法で取得される本発明のポリヘプチドを酵素源として用い、

該受容基質、該酵素源およびUDP-Galを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のグルコースまたはグルコース残基に $\beta 1, 3$ 結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することにより、該反応産物を製造することができる。

酵素源は、アガラクトラクト-N-ネオテトラオース (agalact lacto-N-neotetraose,  $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ ) を基質として、 $37^{\circ}\text{C}$ で1分間に $1\mu$ モルのラクト-N-テトラオース (lacto-N-tetraose,  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ ) を生成することのできる活性を1単位 (U) として、 $0.1\text{mU}/\text{l} \sim 10,000\text{U}/\text{l}$ であり、好ましくは $1\text{mU}/\text{l} \sim 1,000\text{U}/\text{l}$ の濃度で用いる。

水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリス等の緩衝液、メタノール、エタノール等のアルコール類、酢酸エチル等のエステル類、アセトン等のケトン類、アセトアミド等のアミド類等をあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。更に、上記(2)記載の培養により得られた形質転換体の培養液、上記(2)記載の非ヒトトランスジェニック動物より得られたミルクを水性媒体として用いることもできる。

水性媒体に、必要に応じて界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン (例えばナイミーンS-215、日本油脂社製) 等の非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド (例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製) 等のカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネート等のアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン (例えば三級アミンFB、日本油脂社製) 等の三級アミン類等、Gal含有糖質の生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。

界面活性剤は、通常 $0.1 \sim 50\text{g}/\text{l}$ の濃度で用いられる。

有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢

酸エチル等が挙げられ、通常0.1～50 ml/lの濃度で用いられる。

UDP-Galとしては、市販品の他、微生物等の活性を利用して生成した反応液あるいは該反応液から精製したものをを用いることができる。該UDP-Galは0.1～500 mmol/lの濃度で用いることができる。

上記において、N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖としては、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc、GlcNAc $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)Gal $\beta$ 1-4Glc、GlcNAc $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc、GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc、GlcNAc $\beta$ 1-6GalNAc、またはこれらオリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有するオリゴ糖等をあげることができる。

N-アセチルグルコサミン残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質としては、上記オリゴ糖の構造のいずれか一つの構造を糖鎖の非還元末端に有する糖鎖を含有する複合糖質、あるいはアシアロアガラクト複合型N結合型糖鎖を含有する複合糖質等をあげることができる。

受容基質は0.01～500 mmol/lの濃度で用いることができる。

該生成反応において、必要に応じてMnCl<sub>2</sub>等の無機塩、 $\beta$ -メルカプトエタノール、ポリエチレングリコール等を添加することができる。

生成反応は水性媒体中、pH5～10、好ましくはpH6～8、20～50℃の条件で1～96時間行う。

上記方法により生産される糖鎖または複合糖質より、公知の酵素的手法または化学的手法により糖鎖の一部を切り出すことができる〔日本生化学会編、続生化学実験講座、第4巻、複合糖質研究法I, II, 東京化学同人、(1986年)、谷口直之・鈴木明身・古川清・菅原和幸 監修、グリコバイオロジー実験プロトコール、秀潤社、(1996年)〕。

(4) 本発明のポリペプチドを認識する抗体の作製

(i) ポリクローナル抗体の作製

上述(2)の方法により取得したポリペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは本発明のポリペプチドの一部のアミノ酸配列を有するペプチドを

抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該抗原の投与量は動物 1 匹当たり 50～100  $\mu$ g が好ましい。

ペプチドを用いる場合は、ペプチドをスカシガイヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリン等のキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とするペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。

該抗原の投与は、1 回目の投与の後 1～2 週間おきに 3～10 回行う。各投与後、3～7 日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法 (E L I S A 法) : 医学書院刊 1976 年、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清より、下記方法によりポリクローナル抗体を分離、精製することができる。

抗体を分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)〕、または D E A Eーセファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテイン A または Gーカラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

#### (i i) モノクローナル抗体の作製

##### (a) 抗体産性細胞の調製

免疫に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したラットに抗原物質を最終投与した後3～7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリスー塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

#### (b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1（以下、P3-U1と略す）〔Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)、Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)〕、SP2/0-Ag14(SP-2)〔Nature, 276, 269 (1978)〕、P3-X63-Ag8653(653)〔J. Immunol., 123, 1548 (1979)〕、P3-X63-Ag8(X63)〔Nature, 256, 495 (1975)〕等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地〔RPMI-1640培地にグルタミン（1.5 mmol/l）、2-メルカプトエタノール（ $5 \times 10^{-5}$  mol/l）、ジェンタマイシン（10  $\mu$ g/ml）および牛胎児血清（FCS）（CSL社製、10%）を加えた培地（以下、正常培地という）に、さらに8-アザグアニン（15  $\mu$ g/ml）を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を $2 \times 10^7$ 個以上用いる。

#### (c) ハイブリドーマの作製

(a)で取得した抗体産生細胞と(b)で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS（リン酸二ナトリウム 1.83 g、リン酸一カリウム 0.21 g、食塩 7.65 g、蒸留水 1リットル、pH7.2）でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞＝5～10：1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37℃で、 $10^8$ 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000（PEG

-1000) 2 g、MEM 2 ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7 ml を混合した溶液を 0.2~1 ml 添加し、更に 1~2 分間毎に MEM 培地 1~2 ml を数回添加する。

添加後、MEM 培地を加えて全量が 50 ml になるように調製する。該調製液を 900 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地〔正常培地にヒポキサンチン ( $10^{-4}$  mol/l)、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5}$  mol/l) およびアミノプテリン ( $4 \times 10^{-7}$  mol/l) を加えた培地〕100 ml 中に懸濁する。

該懸濁液を 96 穴培養用プレートに  $100 \mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、 $37^\circ\text{C}$  で 7~14 日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとりアンチボディズ〔Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)〕等に述べられている 酵素免疫測定法により、本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドに特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、抗原に用いた本発明のポリペプチドの部分断片ポリペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウス イムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行なう。本発明のポリペプチドに特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返し〔1 回目は、HT 培地 (HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地)、2 回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のポリペプチドの抗ポリペプチド抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。



#### (d)モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristan) 0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明のポリペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。抗体のクラスとは抗体のアイソタイプのことで、ヒトでは、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEがあげられる。サブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4があげられる。

抗体のタンパク質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

#### (5) 本発明のDNAまたはオリゴヌクレオチドを用いた疾患の治療や診断等への利用

本発明のDNAは、アンチセンスRNA/DNA技術〔バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)〕あるいはトリプル・ヘリックス技術〔Trends in Biotechnology, 10, 132 (1992)〕を用いた癌転移抑制等の疾病の治療、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法を用いたそれら癌の診断に利用することが可能である。

例えば、上記(1)記載の本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその

誘導体を投与することにより、本発明のポリペプチドの生産を抑制することができる。

即ち、本発明のDNA、オリゴヌクレオチドまたはその誘導体を用いて、本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写の抑制、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの翻訳の抑制を行うことが可能である。

また、本発明のDNAあるいは該DNAより調製した上記オリゴヌクレオチドを用い、ノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法により、本発明のポリペプチドをコードするDNAの発現量を定量することができる。

更に、本発明のDNAをプローブとして、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコル、秀潤社（1993年）〕を用いて、該遺伝子のプロモーター領域を取得することが可能である。

現在、多くの機能未知のヒト染色体遺伝子の配列がデータベースに登録されている。したがって、本発明のポリペプチドをコードするヒトcDNAの配列と、データベースに登録されてるヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子を同定し、該遺伝子の構造を明らかにできる可能性がある。cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、cDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を決定することができる。

プロモーター領域としては、哺乳動物細胞において本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するすべてのプロモーター領域があげられる。例えば、ヒト大腸癌細胞あるいはヒト膵臓癌細胞で、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写に関与するプロモーター領域をあげることができる。具体的には、例えば、配列番号3で表される塩基配列の1～5000番目の塩基配列中の連続する50～5000bpの配列を有するプロモーターDNAをあげることができる。該プロモーターは後述のスクリーニング法に利用することができる。

糖転移酵素遺伝子には多型や変異が存在することが知られている。例えば、A B O 式血液型の決定に関与する糖転移酵素に関しては、遺伝子多型に基づくアミノ酸配列の違いにより以下の3種の酵素が生成される。

A 型抗原の合成に関与する  $\alpha 1,3$ -N-アセチルガラクトサミン転移酵素、B 型抗原の合成に関与する  $\alpha 1,3$ -ガラクトース転移酵素、および O (H) 型糖鎖の生成に関与する活性を持たない酵素 [Nature, 345, 229-233 (1990)]。

またルイス式血液型の決定に関与する  $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素 (F u c - T I I I) の場合も、遺伝子多型に基づくアミノ酸配列の違いにより、活性が低下または消失した酵素が生成することが知られている [J. Biol. Chem., 269, 29271-29278 (1994)、Blood, 82, 2915-2919 (1993)、J. Biol. Chem., 269, 20987-20994 (1994)、J. Biol. Chem., 272, 21994-21998 (1997)]。

F u c - T I I I 遺伝子の多型は、大腸癌における癌関連糖鎖抗原であるシアリルルイス a 糖鎖の発現と密接な関係があることが知られている [Cancer Res., 56, 330-338 (1996)、Cancer Res., 58, 512-518 (1998)]。

従って、F u c - T I I I の多型を調べることにより、病気の診断や予後の予測を行うことができると考えられる。

本発明の新規  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素は、大腸癌や膵臓癌においてシアリルルイス a 糖鎖またはシアリルルイス c 糖鎖の合成に関与することから、本遺伝子の多型を調べることにより、大腸癌や膵臓癌の診断や予後の予測に利用できる。

また、本遺伝子の多型と、本遺伝子が発現している臓器 (胃、空腸、大腸、膵臓など) における疾患との関連を調べることにより、他の疾患の診断にも利用できる。

本遺伝子の多型解析は、本遺伝子の遺伝子配列情報を用いて行うことができる。具体的には、サザンブロット法、ダイレクトシーケンス法、PCR 法、DNA チップ法などを用いて遺伝子多型を解析することができる [臨床検査, 42, 1507-1517 (1998)、臨床検査, 42, 1565-1570 (1998)]。

(6) 本発明のポリペプチドの利用

(a) 本発明の抗体作製への利用

本発明のポリペプチドを用い、上記(4)の方法により本発明の抗体を作製することができる。

(b) 本発明のポリペプチドを用いる糖鎖、複合糖質製造への利用

本発明のポリペプチドを用い、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖の付加した複合糖質を製造することができる。

(c) 本発明のポリペプチドの活性に関与する物質のスクリーニングへの利用

本発明のポリペプチドは、下記(8)の(a)の方法により、該ポリペプチドの活性を増強または阻害する化合物をスクリーニングすることができる。

(7) 本発明の抗体の利用

(a) 本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの免疫学的検出および定量

本発明のポリペプチドの免疫学的検出法としては、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等をあげることができる。

免疫学的定量法としては、液相中で本発明のポリペプチドと反応する抗体のうちエпитープが異なる2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法、 $^{125}\text{I}$ 等の放射性同位体で標識した本発明のポリペプチドと本発明のポリペプチドを認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等をあげることができる。

上記検出あるいは定量法は、大腸癌、膵臓癌等の診断に利用することができる。

(b) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明の抗体は、医薬、例えば大腸癌、膵臓癌等の疾患の治療薬として用いることができる。

本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として該化合物単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリ

セリン等が例示される。該化合物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}\sim 8\text{mg}/\text{kg}$ である。

#### (8) スクリーニング法への応用

本発明の新規 $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素ポリペプチドは、大腸癌細胞や膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖等のタイプ1糖鎖の合成に関与することから、該ポリペプチドの活性を増強または阻害する化合物を用いて、細胞におけるタイプ1糖鎖の合成量を増加または低下させることが可能である。

また、該ポリペプチドをコードする遺伝子の転写過程、あるいは転写産物からタンパク質への翻訳過程を促進または抑制する化合物は、該ポリペプチドの発現を制御し、細胞におけるタイプ1糖鎖の合成量を制御することが可能である。

タイプ1糖鎖の合成量を抑制する化合物は、癌転移抑制に有用と考えられる。一方、タイプ1糖鎖の合成量を増加させる化合物は、タイプ1糖鎖の合成に有用と考えられる。

上記の化合物は、以下(a)～(e)に示す方法により取得可能である。

(a) 上記(2)で記載した方法を用いて調製した本発明の新規 $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド(精製物あるいは該ポリペプチドを発現する形質転換体の細胞抽出液または培養上清)を酵素として用い、被験試料の存在下、公知の方法〔J. Biol. Chem., 258, 9893-9898 (1983)、J. Biol. Chem., 262, 15649-15658 (1987)、Archi. Biochem. Biophys., 270, 630-646 (1989)、Archi. Biochem. Biophys., 274, 14-25 (1989)、特開平06-181759、J. Biol. Chem., 273, 58-65 (1998)、J. Biol. Chem., 273, 433-440 (1998)、

J. Biol. Chem., 273, 12770-12778 (1998)) を用いて  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を測定し、 $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

(b) 本発明のポリペプチドを発現する細胞または上記(2)で記載した形質転換体を、被験試料の存在下、上記(2)の培養法で2時間から1週間培養後、細胞表面のシアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖等のタイプ1糖鎖の量を、それぞれの糖鎖に対する抗体を用いて測定し、該糖鎖量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

上記抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチド量を、上記(4)で記載した本発明の抗体を用いて測定し、該ポリペプチド量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

本発明の抗体を用いた測定法としては、例えば、マイクロタイタープレートを用いるELISA法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色等を用いた検出法をあげることができる。

(d) 本発明のポリペプチドを発現する細胞を、被験試料の存在下、上記(2)で記載の培養法で2時間から1週間培養後、細胞中の該ポリペプチドをコードする遺伝子転写産物の量を、上記(5)で記載したノーザンハイブリダイゼーション法またはPCR法等の方法を用いて測定し、該転写産物量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

(e) 上記(4)で取得したプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAを組み込んだプラスミドを公知の方法により作製し、上記(2)記載の動物細胞に、上記(2)記載の方法に準じて導入し、形質転換体を取得す

る。該形質転換体を、被験試料の存在下、上記（２）記載の培養法で２時間から１週間培養後、細胞中のレポーター遺伝子の発現量を、公知の方法〔東京大学医科学研究所 制癌研究部編、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社（1993）、*Biotechniques*, 20, 914（1996）、*J. Antibiotics*, 49, 453（1996）、*Trends in Biochemical Sciences*, 20, 448（1995）、細胞工学, 16, 581（1997）〕を用いて測定し、該発現量を増加または低下させる活性を有する化合物を選択・取得する。

レポーター遺伝子としては、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子またはグリーン・フルオレッセント・プロテイン（GFP）遺伝子等をあげることができる。

#### （９）ノックアウト非ヒト動物の作製

本発明のDNAを含むベクターを用い、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ニワトリ、マウス等の胚性幹細胞(embryonic stem cell)において染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAを公知の相同組換えの手法〔例えば、*Nature*, 326, 6110, 295（1987）、*Cell*, 51, 3, 503（1987）等〕により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作成することができる〔例えば、*Nature*, 350, 6315, 243（1991）〕。

このようにして作成した胚性幹細胞クローンと、非ヒト動物の受精卵の胚盤胞(blastocyst)を用い、注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を作成することができる。

該キメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞の染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAに任意の変異を有する個体を得ることができ、さらにその個体の掛け合わせにより相同染色体の双方に変異が入った、ホモ個体（ノックアウト非ヒト動物）を得ることができる。

このようにして動物個体において、染色体上の本発明のポリペプチドをコー



トするDNAの任意の位置へ変異の導入が可能である。例えば染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAの翻訳領域中への塩基置換、欠失、挿入等の変異を導入することにより、その産物の活性を変化させることができる。

またその発現制御領域への同様な変異の導入により、発現の程度、時期、組織特異性等を改変させることも可能である。さらにCre-loxP系との組合せにより、より積極的に発現時期、発現部位、発現量等を制御することも可能である。

このような例として、脳のある特定の領域で発現されるプロモータを利用して、その領域でのみ目的遺伝子を欠失させた例〔Cell, 87, 7, 1317 (1996)〕やCreを発現するアデノウィルスを用いて、目的の時期に、臓器特異的に目的遺伝子を欠失させた例〔Science, 278, 5335, (1997)〕が知られている。

従って染色体上の本発明のポリペプチドをコードするDNAについてもこのように任意の時期や組織で発現を制御できる、または任意の挿入、欠失、置換をその翻訳領域や、発現制御領域に有するノックアウト非ヒト動物を作製することが可能である。

このようなノックアウト非ヒト動物は任意の時期、任意の程度または任意の部位で、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の症状を誘導することができる。

従って、本発明のノックアウト非ヒト動物は、本発明のポリペプチドに起因する種々の疾患の治療や予防において極めて有用な動物モデルとなる。特にその治療薬、予防薬、また機能性食品、健康食品等の評価用モデルとして非常に有用である。

#### 図面の簡単な説明

第1図 第1図のAは、各種ヒト癌細胞株におけるタイプ1糖鎖（シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖）の発現量を測定した結果を示した図である。各細胞を抗シアリルルイスa糖鎖抗体（19-9）、抗ルイスa糖鎖抗体（7LE）、または抗ルイスb糖鎖抗体（Neokokusai）で蛍光抗体染色した後、F

A C Sを用いて解析した。各抗体との反応性が強い順に+++、++、+、±、-で示した。-は抗体との反応性がなかったことを示している。N Tは解析していないことを意味している。

第1図のBは、定量的P C R法を用いて、各種ヒト癌細胞株におけるヒト $\beta$ 3 G a l-T 1、ヒト $\beta$ 3 G a l-T 2、ヒト $\beta$ 3 G a l-T 3およびヒト $\beta$ 3 G a l-T 4の転写産物の量を定量した結果を示した図である。各種細胞株における各 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられる $\beta$ -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した。

第2図 第2図は、プラスミドp B S-3 G T 5の造成工程を示した図である。

第3図 第3図のAは、コントロールプラスミド(p A M o)を導入したNamalwa細胞[Namalwa(mock)]、あるいはヒト $\beta$ 3 G a l-T 5発現プラスミド(p A M o-3 G T 5)を導入したNamalwa細胞(Namalwa-3GT5)について、抗シアリルルイスc糖鎖抗体(DU-PAN-2)を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、F A C Sを用いて解析した結果を示した図である。影をつけたヒストグラムは、DU-PAN-2の代わりにA-P B Sを用いた時の結果である。

第3図のBは、コントロールプラスミド(p A M o)を導入したHCT-15細胞[HCT15(mock)]、あるいはヒト $\beta$ 3 G a l-T 5発現プラスミド(p A M o-3 G T 5)を導入したHCT-15細胞(HCT-3GT5H)について、抗シアリルルイスa糖鎖抗体(19-9)、抗シアリルルイスc糖鎖抗体(DU-PAN-2)、抗ルイスa糖鎖抗体(7LE)または抗ルイスb糖鎖抗体(Neokokusai)を用いて間接蛍光抗体染色を行なった後、F A C Sを用いて解析した結果を示した図である。影をつけたヒストグラムは、DU-PAN-2の代わりにA-P B Sを用いた時の結果である。

第4図 第4図のAは、定量的P C R法を用いて、各種ヒト癌細胞株におけるヒト $\beta$ 3 G a l-T 5の転写産物の量を定量した結果を示した図である。各種細胞株におけるヒト $\beta$ 3 G a l-T 5の転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられる $\beta$ -アクチンの転写産物の量を1000と

した時の相対値として表示した。

第4図のBは、ウエスタン・ブロッティング解析により、各種ヒト癌細胞株におけるCA19-9抗原含有タンパク質の発現を調べた結果を示した図である。

第5図 第5図は、定量的PCR法を用いて、各種ヒト組織におけるヒト $\beta$ 3Gal-T5の転写産物の量を定量した結果を示した図である。各組織におけるヒト $\beta$ 3Gal-T5の転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられる $\beta$ -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した。

第6図 第6図のAは、ヒト $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子の構造を示した図である。4つのエクソンは四角で、イントロンは線で示してある。エクソン2中にはXbaIサイトが、エクソン3中にはBsmIサイトが存在している。コーディング領域 (open reading frame) は、斜線で示してある。ヒト $\beta$ 3Gal-T5 cDNAのアイソフォームの解析に使用したプライマー (si-1、si-2、si-3、si-4) の位置を矢印で示した。

第6図のBは、ヒト $\beta$ 3Gal-T5 cDNAのアイソフォームの構造を示した図である。存在比は、Colo205細胞における各アイソフォームの発現量をパーセンテージで示したものである。

第6図のCは、RT-PCR法を用いて、Colo205細胞におけるヒト $\beta$ 3Gal-T5 cDNAの各アイソフォームの発現量を調べた結果を示した図である。図6Aに示したプライマーの組み合わせでRT-PCRを行った後、第6図中に示した制限酵素 (XbaIまたはBsmI) で切断してアイソフォームの特定を行った。noneは制限酵素処理をしないことを意味している。左のレーンは分子量マーカー (100bpラダー) である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例を示す。遺伝子操作的手法として、断らない限りモレキュラー・クローニング第2版に記載された方法を用いた。

実施例1 各種細胞株におけるタイプ1糖鎖の発現量と既知 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量の測定

各種ヒト癌細胞株におけるタイプ1糖鎖（シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖）の発現量と既知のヒト $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を測定することにより、大腸癌細胞株あるいは膵臓癌細胞株でタイプ1糖鎖の合成に関与する $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素の同定を試みた。

各種細胞株におけるタイプ1糖鎖（シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖）の発現量の測定は、抗シアリルルイスa糖鎖抗体、抗ルイスa糖鎖抗体、または抗ルイスb糖鎖抗体を用いた蛍光抗体染色後、FACSを用いて解析することにより行った（第1図のA）。

各種ヒト細胞株における既知 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素（ $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2、 $\beta$ 3Gal-T3、 $\beta$ 3Gal-T4）遺伝子の転写物の定量は、RT-PCR法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 2725 (1990)、J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)、特開平06-181759、J. Biol. Chem., 273, 26729 (1998)〕を用いて行った。各種細胞株における各 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子転写産物の量は、いずれの細胞においても同程度発現していると考えられる $\beta$ -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した（第1図のB）。

(1) 各種細胞株におけるタイプ1糖鎖（シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖）の発現量の測定

細胞株としては、大腸癌細胞株（Colo205、Colo201、SW1116、LS180、HT29、WiDr、HCT-15、SW480、SW620）、膵臓癌細胞株（Capan-1、Capan-2）、胃癌細胞株（KATOIII、MKN45、MKN74）、肺癌細胞株（PC-1）、神経芽細胞腫細胞株（SK-N-MC、SK-N-SH）、リンパ腫細胞株（Namalwa、Jurkat）、前立腺癌細胞株（PC-3）を用いた。

Colo205、Colo201、LS180、HT29、WiDr、HCT-15、SW480、SW620、Capan-1、

Capan-2、KATOIII、MKN45、MKN74、PC-1、SK-N-MC、SK-N-SH、Namalwa、PC-3はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection; ATCC)より入手した。また、SW1116 (ATCCより入手可能) およびJurkat (理研ジーンバンク; RIKEN GENE BANKより入手可能) は愛知県がんセンターの高橋博士より入手した。

上記の細胞をそれぞれの細胞に適した培地で培養後、各細胞を抗シアリルルイスa糖鎖抗体 (19-9)、抗ルイスa糖鎖抗体 (7LE)、または抗ルイスb糖鎖抗体 (Neokokusai社製) を用いて蛍光抗体染色し、FACSを用いて解析した。

具体的方法を以下に示す。

各細胞 (約  $1 \times 10^6$ ) をマイクロチューブ (1.5 ml : エッペンドルフ社製) にとり、遠心分離 ( $550 \times g$ 、7分間) により細胞を集めた。

該細胞を0.9 mlの0.1%のアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝液PBS (A-PBS:  $8 g/l$  NaCl、 $0.2 g/l$  KCl、 $1.15 g/l$   $Na_2HPO_4$  (無水)、 $0.2 g/l$   $KH_2PO_4$ 、0.1% アジ化ナトリウム) で洗浄した後、該洗浄細胞にA-PBSで約  $10 \mu g/ml$  に希釈した上記抗糖鎖抗体を  $20 \mu l$  加えて懸濁し、 $4^\circ C$  で1時間反応させた。

反応後、細胞を0.9 mlのA-PBSで1回洗浄した後、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) で蛍光標識した抗マウスIgM/IgG抗体 (Bio-Rad社製) をA-PBSで16倍希釈した溶液を  $20 \mu l$  加えて懸濁し、 $4^\circ C$  で30分間反応させた。

反応後、細胞を0.9 mlのA-PBSで1回洗浄した後、0.6 mlのA-PBSに懸濁し、フルオレッセンス・アクティベーター・セル・ソーター [エビックス・エリート・フローサイトメーター (EPICS Elite Flow Cytometer); コールター (COULTER) 社製] を用いて解析を行なった。また対照実験として、抗糖鎖抗体の代わりにA-PBSを用いて同様の解析を行なった。

結果を第1図のAに示す。大腸癌細胞株であるColo205、Colo201、SW1116、および膵臓癌細胞株であるCapan-2においてタイプ1糖鎖が多く発現している

こと確認した。

(2) 各種ヒト細胞株における既知 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ -ガラクトース転移酵素( $\beta 3$  Gal-T1、 $\beta 3$  Gal-T2、 $\beta 3$  Gal-T3、 $\beta 3$  Gal-T4) 遺伝子の転写物の定量

(a) 各種細胞株由来一本鎖cDNAの調製

上記(1)記載の細胞株から酸グアニジウム チオシアネート フェノールクロロホルム法[Anal. Biochem., 162, 156-159]により全RNAを抽出した。

全RNA各々6  $\mu$ gに、デオキシリボヌクレアーゼI (Life Technologies社製)を5単位/mlずつ添加し、室温で5分間反応させた。反応後、65°Cで15分間加熱することにより、酵素を失活させた。

得られた全RNA各々について、オリゴ(dT)プライマーを用いてSUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA System (Life Technologies社)によりcDNAを合成した。反応は20  $\mu$ lで行い、反応後の溶液を水で50倍希釈し、使用するまで-80°Cで保管した。

(b) スタンダードと内部コントロールの調製

検量線の作成に用いるスタンダードとしては、ヒト $\beta 3$  Gal-T1、ヒト $\beta 3$  Gal-T2、ヒト $\beta 3$  Gal-T3、ヒト $\beta 3$  Gal-T4の各cDNAをpUC119またはpBluescript SK(-)に組み込んだプラスミド(pUC119-3GT1、pBS-3GT2、pBS-3GT3、pBS-3GT4)を、各cDNA部分を切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状DNAに変換したものをを用いた。

pUC119-3GT1は、特開平6-181759記載のプラスミドpUC119-WM1 (FERM B P-4011)と同じものである。ヒト $\beta 3$  Gal-T2、ヒト $\beta 3$  Gal-T3およびヒト $\beta 3$  Gal-T4の各cDNAの取得は、以下のように行った。

各cDNAの配列に特異的なプライマーを用いてPCRを行うことにより各cDNAの断片を取得した。

取得された各cDNA断片をプローブとして用いて、コロニーハイブリダイゼーションまたはブラークハイブリダイゼーションを行うことにより、それぞ

れのcDNAを取得した。ヒト $\beta$ 3Gal-T2、ヒト $\beta$ 3Gal-T3およびヒト $\beta$ 3Gal-T4の塩基配列を、LI-COR社のDNAシーケンサー (dNA sequencer model 4000L) またはパーキンエルマー社のDNAシーケンサー377と、各シーケンサー用の反応キットを用いて決定し、それぞれヒト $\beta$ 3Gal-T2、ヒト $\beta$ 3Gal-T3、ならびにヒト $\beta$ 3Gal-T4をコードすることを確認した。各cDNAは公知の配列をもとにしたPCRによっても得ることができる。

$\beta$ -アクチンの転写産物定量用のスタンダードとしては、pUC119-ACTをcDNA部分を切り出す制限酵素 (HindIIIとAsp718) で切断して直鎖状DNAに変換したものをを用いた [J. Biol. Chem., 269, 14730(1994)、特開平06-181759]。

内部コントロールとしては、下記のようにして調製したプラスミド (pBS-3GT1d、pBS-3GT2d、pBS-3GT3d、pBS-3GT4d) を、各cDNAを切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状DNAに変換したものをを用いた。

pUC119-3GT1において、ヒト $\beta$ 3Gal-T1 cDNA中のBanII-EcoRV間212bpを欠失させることによりpUC119-3GT1dを作製した。

pBS-3GT2において、ヒト $\beta$ 3Gal-T2 cDNA中のAflIII-BstEII間258bpを欠失させることによりpBS-3GT2dを作製した。

pBS-3GT3において、ヒト $\beta$ 3Gal-T3 cDNA中のStyI-StyI間183bpを欠失させることによりpBS-3GT3dを作製した。

pBS-3GT4において、ヒト $\beta$ 3Gal-T4 cDNA中のAccIII-StyI間253bpを欠失させることによりpBS-3GT4dを作製した。

$\beta$ -アクチンの転写産物定量用の内部コントロールとしては、pUC119-ACTdをcDNA部分を切り出す制限酵素 (HindIIIとAsp718) で切断して直鎖状DNAに変換したものをを用いた [J. Biol. Chem., 269, 14730(1994)、特開平06-181759]。

(c) RT-PCRによる転写量の定量

上記各組織由来の cDNA 10  $\mu$ l および内部コントロール用プラスミド 10  $\mu$ l (10 fg) を含む 50  $\mu$ l の反応溶液 [10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.3)、50 mmol/l KCl、1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>、0.2 mmol/l dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2  $\mu$ mol/l 遺伝子特異的プライマー] で、DNA ポリメラーゼ AmpliTaq Gold™ (Parkin Elmer 社製) を用いて PCR を行った。

各遺伝子特異的プライマーの塩基配列を第 1 表に示した。また、 $\beta$ 3Gal-T1 遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号 4、5 に、 $\beta$ 3Gal-T2 遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号 6、7 に、 $\beta$ 3Gal-T3 遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号 8、9 に、 $\beta$ 3Gal-T4 遺伝子特異的プライマーの塩基配列を配列番号 10、11 に、 $\beta$ -アクチン特異的プライマーの塩基配列を配列番号 12、13 に示した。

第 1 表 定量的 PCR に使用した条件とプライマー

ターゲット 遺伝子	*プライマーセット	PCR 産物のサイズ (bp)		アニーリング 温度 (°C)
		ターゲット	コンペティター	
$\beta$ 3Gal-T1	F: 5' -TTCAGCCACCTAACAGTTGCCAGG- R: 5' -ATACCTTCTTCGTGGCTTGGTGGAG-	495	283	60
$\beta$ 3Gal-T2	F: 5' -TAGAAGCTAGAAGAGCTATTTCGGC- R: 5' -ACTCGCCAGTGATTGAACACAAAC-	616	358	60
$\beta$ 3Gal-T3	F: 5' -CCCAATGCCAAGTACGTAATGAAG- R: 5' -TGTGGTGTTCCTTAGCATGACCTG-	474	291	60
$\beta$ 3Gal-T4	F: 5' -TTGATCCCCAACCAGGAAGCTTGC- R: 5' -TGAGGCCACTGCTCCTCTGATACG-	590	337	68
$\beta$ 3Gal-T5	F: 5' -ACCACCAGCAGTGCAGCGGAAAC- R: 5' -GCCACGATCCTCCTGAAGAGGCA-	554	410	65
$\beta$ -Actin	F: 5' -GATATCGCCGCGCTCGTCGTCGAC- R: 5' -CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-	789	639	60

\* F: フォワードプライマー、R: リバースプライマー

上記プライマーのセットにより、各遺伝子転写産物および各スタンダードからは、第 1 表のターゲットのところに示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。一方、上記プライマーのセットにより、各内部コントロールからは、第 1 表のコンペティターのところに示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。



PCRは、95℃で11分間の加熱後、95℃で1分間、各遺伝子に適した第1表に記載のアニーリング温度で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子群については42サイクル、 $\beta$ -アクチンについては24サイクルの条件で行った。

PCR後の溶液のうち10 $\mu$ lを1%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、写真を撮影した。写真をNIHイメージシステムによりスキニングすることにより増幅した断片の染色の強さを測定し、増幅量とした。

細胞由来cDNAのかわりに上記で調製したスタンダードプラスミドを1.25fg、2.5fg、5fg、10fg、20fg、40fg用いて、PCRを行い、増幅断片の増幅量を測定し、cDNAの量と断片の増幅量をプロットして検量線を作成した。

この検量線と各細胞由来cDNAでの断片の増幅量から、各細胞でのcDNAの量を計算し、これを各細胞でのmRNA転写量すなわち遺伝子の発現量とした。なお、 $\beta$ -アクチンは各細胞で普遍的に発現している遺伝子と考えられるため、どの細胞においてもその発現量は同程度と考えられる。従って、各細胞における $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量の差は、cDNA合成反応の効率の差と考えられるため $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を比較する際に $\beta$ -アクチンの発現量も考慮した。

各種細胞株における各 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子転写産物の量を、 $\beta$ -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した(第1図のB)。

$\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2および $\beta$ 3Gal-T3はGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成する活性を有しているが、タイプ1糖鎖を多く発現している大腸癌細胞株(Colo205、Colo201、SW1116)および膵臓癌細胞株(Capan-2)ではほとんど発現していなかった。一方、 $\beta$ 3Gal-T4は大腸癌細胞株(Colo205、Colo201、SW1116)および膵臓癌細胞株(Capan-2)で発現がみられ

たが、この酵素はGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成する活性を有していないことが明らかになっている。

以上の結果から、これらの細胞株においてタイプ1糖鎖の合成に関与している $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素は、新規の酵素であることが明らかになった。

実施例2 大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイスa糖鎖等のタイプ1糖鎖の合成に関与する、新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子(cDNA)のクローン化

(1) ヒト大腸癌細胞株Colo205からのmRNAの取得

ヒト大腸癌細胞株Colo205より、ロッシュ(Roche)社製のmRNA抽出キットであるOligotex<sup>TM</sup>-dT30<super>を用いて、約30 $\mu$ gのmRNAを取得した。

具体的試薬および方法は、キットに添付されている説明書に従った。

(2) ヒト大腸癌細胞株Colo205由来cDNAのライブラリーの作製

上記(1)で取得したヒト大腸癌細胞株Colo205由来のmRNA 8 $\mu$ g、およびGIBCO BRL社製のキット(SUPERScript Choice System for cDNA Synthesis)を用い、オリゴdTをプライマーとして2本鎖cDNAを合成した。

これら二本鎖cDNAの両末端に以下の方法でSfiIリンカーを付与した。

[SfiIリンカーの付与]

配列番号14で示された一本鎖DNAおよび配列番号15で示された一本鎖DNAをアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

該合成一本鎖DNAをそれぞれ50 $\mu$ gずつ、別々に50mmol/l トリス-HCl (pH7.5)、10mmol/l MgCl<sub>2</sub>、5mmol/l ジチオスレイトール(以下、DTTと略記する)、0.1mmol/l EDTAおよび1mmol/l ATPを含む緩衝液(以下、T4キナーゼ緩衝液と略記する)50 $\mu$ lに溶解し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)30

単位を加えて、37℃で16時間リン酸化反応を行ない、11塩基および8塩基のリンカーを取得した。

11塩基のリンカー 4  $\mu$ g、8塩基のリンカー 2.9  $\mu$ gおよび上記で合成した2本鎖cDNAをT4リガーゼ緩衝液45  $\mu$ lに溶解後、T4 DNAリガーゼ1050単位を加え、16℃で16時間反応させ、該二本鎖DNA各々にSfiIリンカーを付与した。

得られた反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約1.5 kb以上のDNA断片を回収した。

直接発現クローニングベクター (Expression Cloning Vector) であるpAMo〔J.Biol.Chem., 268, 22782(1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)〕24  $\mu$ gを、10 mmol/l トリス-HCl (pH 7.5)、6 mmol/l MgCl<sub>2</sub>、50 mmol/l NaCl、6 mmol/l 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液 (以下、Y-50緩衝液と略記する) 590  $\mu$ lに溶解後、80単位のSfiI (宝酒造社製、以下、特に断らないかぎり制限酵素は宝酒造社製のものをを用いた) を加え、37℃で16時間消化反応を行なった。

該反応液に40単位のBamHIを加え、37℃で2時間消化反応を行なった。該反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、約8.8 kbのDNA断片を回収した。

上記で調製したSfiIリンカーを付与したDNA (mRNA 8  $\mu$ g由来分) をT4リガーゼ緩衝液250  $\mu$ lに溶解後、それぞれの溶解液に、該約8.8 kbのDNA断片2  $\mu$ gおよびT4 DNAリガーゼ2000単位を加えて、16℃で16時間結合反応を行なった。

反応後、それぞれの反応液にトランスファーRNA (tRNA) 5  $\mu$ gを添加し、エタノール沈殿後、10 mmol/l トリス-HCl (pH 8.0) および1 mmol/l EDTA (エチレンジアミン4酢酸ナトリウム) からなる緩衝液 (以下、TE緩衝液と略記する) 20  $\mu$ lに溶解した。

該反応液を用い、エレクトロポレーション法〔Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)〕により大腸菌LE392株〔モレキュラー・クローニング第2版〕を形質転換し、約100万個のアンピシリン耐性を有する形質転換体を取得し、cDNAライブラリーを構築した。

更に、該cDNAライブラリー（大腸菌）および、キアジェン（Qiagen）社製のプラスミド調製キットである／plasmid／maxi kit（商品番号 41031）を用い、cDNAを含有するプラスミドを調製した。

（3）degenerateプライマーを用いた新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素cDNA断片の取得

既知の4種の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素（ $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2、 $\beta$ 3Gal-T3、 $\beta$ 3Gal-T4）のアミノ酸配列を比較することにより、4種の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素でアミノ酸配列がよく保存されている領域を3ヶ所以上見出した。該3領域をN末端側から順にモチーフ1、モチーフ2、モチーフ3と呼ぶ。上記4種の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素における各モチーフのアミノ酸配列と各モチーフの最初のアミノ酸のN末端からの番号を第2表に示す。

第2表  $\beta$ 3Gal-Tファミリーにおいて保存されたアミノ酸配列モチーフ

	モチーフ 1	モチーフ 2	モチーフ 3
$\beta$ 3Gal-T1	A <sup>99</sup> IRETWG	Y <sup>172</sup> VMKTDSD	E <sup>264</sup> DVYVGLC
$\beta$ 3Gal-T2	A <sup>169</sup> IRQTWG	Y <sup>247</sup> VMKTDSD	E <sup>340</sup> DVYVGIC
$\beta$ 3Gal-T3	A <sup>96</sup> IRVTWG	Y <sup>175</sup> VMKTDTD	E <sup>266</sup> DVYVGIC
$\beta$ 3Gal-T4	A <sup>89</sup> IRASWG	Y <sup>170</sup> VLKTDDD	E <sup>290</sup> DFYVGVS

公知の方法〔Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksler, "PCR Primer: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Lab.(1995)、井上純一郎・仙波憲太

郎編, ザ・プロトコールシリーズ「cDNAクローニング」, 羊土社, (1996年)、Science, 241, 42 (1988)) に従って、各モチーフのアミノ酸配列に対応する塩基配列を有するdegenerateプライマーを設計した。フォワードプライマーとしてモチーフ1とモチーフ2に対応する2種の合成DNA (それぞれの配列を配列番号16と配列番号17に示す) を合成した。また、リバープライマーとして、モチーフ2とモチーフ3に対応する2種の合成DNA (それぞれの配列を配列番号18と配列番号19に示す) を合成した。

配列番号16記載のDNAと配列番号18記載のDNAをプライマー、上記(2)で調製したcDNAライブラリー(プラスミド)を鋳型としてPCRを行い、増幅断片の末端をDNAポリメラーゼクレノー断片を用いて平滑末端に変換した後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) のEcoRVサイトにサブクローニングした。また、配列番号17記載のDNAと配列番号19記載のDNAをプライマー、上記(2)で調製したcDNAライブラリー(プラスミド)を鋳型としてPCRを行い、増幅断片の末端をDNAポリメラーゼクレノー断片を用いて平滑末端に変換した後、pBluescript SK(-) (Stratagene社製) のEcoRVサイトにサブクローニングした。

上記(2)で調製したcDNAライブラリー(プラスミド100ng)を含む50 $\mu$ lの反応溶液〔10mmol/l Tris-HCl (pH8.3)、50mmol/l KCl、1.5mmol/l MgCl<sub>2</sub>、0.2mmol/l dNTP、0.001% (w/v) ゼラチン、0.2 $\mu$ mol/l プライマー〕に、1UのDNAポリメラーゼAmpliTaq Gold™ (Parkin Elmer社) を添加し、PCRを行った。

PCRは、95℃で11分間の加熱後、95℃で30秒間、35℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、45サイクルの条件で行った。

サブクローニングしたPCR増幅断片の塩基配列は、EPICENTRE TECHNOLOGIES社のキット (SequiTherm EXCEL II Long-Read DNA Sequencing kit-ALF : Catalog

No. SE8301A) とALF DNAシーケンサー (アマーシャム ファルマシア バイオテック社製) を用いて決定した。

その結果、配列番号16記載のDNAと配列番号18記載のDNAをプライマーとして用いたPCRにより、既知の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列とホモロジーを有するが完全には一致しないアミノ酸配列をコードするDNA断片を1種取得した。

該DNA断片のプライマー部分を除く配列は、配列番号2記載のDNAの643番目から851番目の塩基配列と一致していた。

また、配列番号17記載のDNAと配列番号19記載のDNAをプライマーとして用いたPCRにより、既知の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素のアミノ酸配列とホモロジーを有するが完全には一致しないアミノ酸配列をコードするDNA断片を1種取得した。

該DNA断片のプライマー部分を除く配列は、配列番号2記載のDNAの876番目から1124番目の塩基配列と一致していた。

#### (4) 新規 $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素cDNAの取得

上記(3)で取得した2種のPCR増幅断片を混合後、マルチプライムDNA標識システム (アマシャム社) を用いて $^{32}\text{P}$ で標識し、プローブを作製した。

該プローブを用いて、上記(2)で作製したcDNAライブラリーの内の $5 \times 10^5$ クローンについてコロニーハイブリダイゼーションを行った。

該ハイブリダイゼーションにおいて、フィルターを、2倍濃度のSSPE〔1倍濃度のSSPEの組成は、 $180\text{mmol/l}$  塩化ナトリウム、 $10\text{mmol/l}$  リン酸二水素ナトリウム、 $1\text{mmol/l}$  エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) よりなる (pH 7.4)〕、0.1% SDSよりなる緩衝液中で $65^\circ\text{C}$ 、10分間振とうする条件で2回、1倍濃度のSSPE、0.1% SDSからなる緩衝液中で $65^\circ\text{C}$ 、15分間振とうする条件で1回、 $0.2 \times \text{SSPE}$ 、0.1% SDSからなる緩衝液中で $65^\circ\text{C}$ 、10分間振とうする条件で2回洗浄した。

該コロニーハイブリダイゼーションの結果、ハイブリダイズする2個の独立したプラスミドが得られた。

(5) プラスミド pAMo-3GT5 中に挿入されている cDNA の塩基配列の決定

上記(4)で得られたプラスミドの1つである pAMo-3GT5 が含む cDNA の全塩基配列を、以下の方法で決定した。

pAMo ベクター中の配列に特異的なプライマーを用いて、該 cDNA の 5' 側および 3' 側の配列を決定した。

決定された配列に特異的な合成 DNA を調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。

該操作を繰り返すことにより、該 cDNA の全塩基配列を決定した。

塩基配列の決定には、LI-COR 社の DNA シークエンサー (dna sequencer model 4000L) と反応キット (SequitheRM EXCEL II™ Long-Read™ DNA-sequencing kit-Lc:エア・ブラウン)、またはパーキンエルマー社の DNA シークエンサー 377 と反応キット (ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit:Applied Biosystems 社) を使用した。

pAMo-3GT5 が含む cDNA の全塩基配列 (2775 bp) を配列番号 2 に示した。

該 cDNA は、糖転移酵素に特徴的な構造を有する 310 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。

該ポリペプチドはこれまでにクローン化された4種のヒト  $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素 ( $\beta$ 3Gal-T1、 $\beta$ 3Gal-T2、 $\beta$ 3Gal-T3、 $\beta$ 3Gal-T4) とアミノ酸レベルで 28%~37% の相同性を示したことから、新規な  $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素であると考えられた。該アミノ酸配列のホモロジー解析は、配列解析ソフト GENETYX-MAC 10.1 (ソフトウェア開発株式会社) を用いて行った。一致したアミノ酸残基数を  $\beta$ 3Gal-T5 のアミノ酸残基数で割ることにより、ホモロジー (%) を算出した。

該ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号1に示した。

該ポリペプチドは、N末端の7アミノ酸からなる細胞質領域、それに続く19アミノ酸からなる疎水性に富む膜結合領域、少なくとも4アミノ酸からなる幹領域、および触媒領域を含む残りの大半のC末端部分からなると考えられた。他の $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素とのアミノ酸配列上の相同性の比較、ならびに他の $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素の幹領域と触媒領域に関する知見〔特開平6-181759〕を基に、幹領域は少なくとも4アミノ酸からなると予想された。したがって、31番目から310番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドは、触媒領域を含むと考えられる。

以下、該cDNAをヒト $\beta$ 3Gal-T5 cDNA、該cDNAがコードするポリペプチドをヒト $\beta$ 3Gal-T5と呼ぶ。

pAMo-3GT5をHindIIIとNotIで切断することによりヒト $\beta$ 3Gal-T5 cDNAを切り出し、pBluescript II SK(+)のHindIIIとNotIサイト間に組み込むことにより、pBS-3GT5を造成した(第2図)。

pBS-3GT5を含む大腸菌である*Escherichia coli* MM294/pBS-3GT5は、平成11年2月10日付で工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 郵便番号305-8566)にFERM BP-6645として寄託されている。

(6) ヒト $\beta$ 3Gal-T5発現プラスミドを導入したヒト培養細胞におけるタイプ1糖鎖の合成

コントロールプラスミド(pAMo)およびヒト $\beta$ 3Gal-T5発現プラスミド(pAMo-3GT5)をそれぞれ、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液に溶解した後、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133(1990)〕によりNamalwa細胞に導入し、形質転換細胞を得た。

1.  $6 \times 10^6$ 細胞あたり $4\mu\text{g}$ のプラスミドを導入した後、10%のウシ胎児血清を含むRPMI1640培地〔7.5%  $\text{NaHCO}_3$ を1/40量、200mmol/l 1-L-グルタミン溶液(GIBCO社製)を3%、ペニシリン・ストレプトマイ



イシン溶液 (GIBCO 社製、5000units/ml ペニシリン、5000 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン) を 0.5% 添加した RPMI1640 培地 (日水製薬社製) 8 ml に懸濁し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37°C で 24 時間培養した。

培養後、G418 (ギブコ社製) を 0.8 mg/ml になるように添加し、更に 14 日間培養し安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、0.8 mg/ml の G418 を含む RPMI1640 で継代した。

該形質転換細胞について、抗シアリルルイス c 糖鎖抗体 (DU-PAN-2: Kyowa Medex 社製) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった。

間接蛍光抗体染色は、実施例 1 の (1) に記載した方法に従って行った。その結果、pAMo-3GT5 を導入した細胞においては、pAMo を導入した細胞に比較して、抗シアリルルイス c 糖鎖抗体 (DU-PAN-2) への反応性が大幅に増加していた (第 3 図の A)。

また、コントロールプラスミド (pAMo) およびヒト  $\beta$ 3Gal-T5 発現プラスミド (pAMo-3GT5) を上記と同様の方法により、タイプ 1 糖鎖を発現していない大腸癌細胞株である HCT-15 に導入し、安定形質転換細胞を得た。次いで、限界希釈法を用いて該形質転換細胞からシングルクローン

(HCT-3GT5L および HCT-3GT5H) を取得した。HCT-3GT5L における  $\beta$ 3Gal-T5 転写物の量は、HCT-3GT5H における  $\beta$ 3Gal-T5 転写物の量に比較して少ない (実施例 4 および第 3 表参照)。該シングルクローンは、0.8 mg/ml の G418 を含む RPMI1640 で継代した。

取得したシングルクローン (HCT-3GT5H) について、抗シアリルルイス a 糖鎖抗体 (19-9)、抗シアリルルイス c 糖鎖抗体 (DU-PAN-2: Kyowa Medex 社製)、抗ルイス a 糖鎖抗体 (7LE)、または抗ルイス b 糖鎖抗体 (ネオ国際社製) を用いて間接蛍光抗体染色を行なった。

間接蛍光抗体染色は、実施例 1 の (1) に記載した方法に従って行った。その結果、pAMo-3GT5 を導入した細胞においては、pAMo を導入した細胞に比較して、4 種の抗体全てへの反応性が大幅に増加していることが明ら

かになった（第3図のB）。

以上の結果から、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$ は形質転換細胞中で、タイプ1糖鎖（シアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖、ルイスa糖鎖およびルイスb糖鎖）を合成可能であることが示された。

またこの結果は、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$ を細胞で発現させることにより、タイプ1糖鎖（シアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖、ルイスa糖鎖およびルイスb糖鎖等）を含有する糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質を新たに合成できることを意味している。

以上のことより、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$ を発現させた細胞を宿主として、有用な糖タンパク質を分泌生産することにより、分泌生産される糖タンパク質にタイプ1糖鎖（シアリルルイスa糖鎖、シアリルルイスc糖鎖、ルイスa糖鎖およびルイスb糖鎖等）を付与することが可能である。

（7）各種ヒト細胞株におけるヒト $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 遺伝子の転写物の定量  
実施例1の（2）の方法に従って、ヒト $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 遺伝子の転写物の定量を行った。

鋳型として用いる各種細胞株由来一本鎖cDNAは、実施例1（1）で調製したものを使用した。

検量線の作成に用いるスタンダードとしては、上記（5）で造成したヒト $\beta 3 \text{Gal-T}5$  cDNAをpBluescript II SK(+)に組み込んだプラスミド（pBS-3GT5）を、cDNA部分を切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状DNAに変換したものをを用いた。

内部コントロールとしては、下記のようにして調製したプラスミド（pBS-3GT5d）を、cDNAを切り出す適当な制限酵素で切断し、直鎖状DNAに変換したものをを用いた。

pBS-3GT5において、ヒト $\beta 3 \text{Gal-T}5$  cDNA中のEco81I-XcmI間144bpを欠失させることによりpBS-3GT5dを作成した。

RT-PCRによる転写量の定量は、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 特異的プライマーを

用いて、実施例1の(2)と同様にして行った。 $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 特異的プライマーの塩基配列を第1表ならびに配列番号20、21に示した。

$\beta 3 \text{Gal-T}5$ 特異的プライマーにより、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 遺伝子転写産物およびスタンダードからは、第1表のターゲットのところに示したサイズ(554bp)のDNA断片を増幅させることができる。一方、上記プライマーにより、内部コントロールからは、第1表のコンペティターのところに示したサイズ(410bp)のDNA断片を増幅させることができる。

PCRは、95℃で11分間の加熱後、95℃で1分間、65℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、42サイクル繰り返す条件で行った。

各種細胞株における $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 遺伝子転写産物の量を、 $\beta$ -アクチンの転写産物の量を1000とした時の相対値として表示した(第4図のA)。

$\beta 3 \text{Gal-T}5$ 転写産物は、タイプ1糖鎖を多く発現している大腸癌細胞株(Colo205、Colo201、SW1116)および膵臓癌細胞株(Capan-2)で発現していることが判明した。また、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$ 転写産物の発現は、タイプ1糖鎖の発現(第1図参照)とよく相関していた。

以上の結果と上記(5)および(6)の結果を総合すると、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$ は、大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、シアリルルイスa糖鎖やシアリルルイスc糖鎖等のタイプ1糖鎖の合成に関与する、新規 $\beta 1$ , 3-ガラクトース転移酵素であると結論される。

#### (8) 各種ヒト細胞株におけるCA19-9抗原含有タンパク質の発現

抗シアリルルイスa抗体(19-9)を用いたウエスタン・ブロッティング解析を行うことにより、大腸癌細胞株(Colo205、Colo201、SW1116、LS180、HT29、WiDr、HCT-15、SW480、SW620)、膵臓癌細胞株(Capan-1、Capan-2)、胃癌細胞株(KATOIII、MKN45、MKN74)におけるシアリルルイスa糖鎖含有タンパク質の発現について検討した。

19-9は大腸癌や膵臓癌における癌関連糖鎖の検出に利用されており、

検出されるシアリルルイス a 糖鎖抗原は、CA19-9 抗原と呼ばれている。

各細胞 ( $1 \times 10^7$  個) を、溶液 [ $20 \text{ mmol/l}$  HEPES (pH 7.2)、 $2\%$  TironX-100] に懸濁後、短時間超音波にかけて細胞溶解液を調製した。

該細胞溶解液のタンパク質濃度を、マイクロBCAタンパク質アッセイ試薬キット (PIERCE社) により測定し、 $10 \mu\text{g}$  のタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

電気泳動後、Transblot SD cell (Bio-Rad社製) を用いて、ゲル上のタンパク質をImmobilon PVDF膜 (Millipore社製) に移した。

該膜をブロッキング溶液 ( $5\%$  のスキムミルクを含むPBS) で  $4^\circ\text{C}$  で終夜処理することによりブロッキングした。

ブロッキング後、該膜をブロッキング溶液で希釈した  $10 \mu\text{g/ml}$  の抗シアリルルイス a 抗体 (19-9) を用いて、室温で2時間処理した。

処理後、ECL Western blotting detection reagent (Amersham社製) を用いて該膜を処理することにより、19-9が結合したタンパク質の検出を行った。方法はキットの説明書に従った。

結果を第4図のBに示した。

CA19-9含有糖タンパク質の発現は、上記(7)で測定した $\beta 3 \text{ Gal-T}5$  転写産物の発現 (図4のA参照) とよく一致していた。一方、他のGlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素 ( $\beta 3 \text{ Gal-T}1$ 、 $\beta 3 \text{ Gal-T}2$ 、 $\beta 3 \text{ Gal-T}3$ ) の転写物の発現は、CA19-9含有糖タンパク質の発現と相関していなかった。また、他のGlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素 ( $\beta 3 \text{ Gal-T}1$ 、 $\beta 3 \text{ Gal-T}2$ 、 $\beta 3 \text{ Gal-T}3$ ) は、CA19-9含有糖タンパク質を高発現している Colo205やColo201で発現していなかった (第1図参照)。

以上の結果は、 $\beta 3 \text{ Gal-T}5$  は大腸癌や膵臓癌等における癌関連抗原 CA19-9の合成に関与する $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素であることを示している。更に、 $\beta 3 \text{ Gal-T}5$  が糖タンパク質も基質として使用できることを

示している。

実施例3 ヒト $\beta$ 3Gal-T5のin vitro活性

実施例2で取得したヒト $\beta$ 3Gal-T5 cDNAがコードするヒト $\beta$ 3Gal-T5のin vitroでの活性を以下のようにして調べた。

他の既知の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素と活性を比較するため、ヒト $\beta$ 3Gal-T1、ヒト $\beta$ 3Gal-T2、ヒト $\beta$ 3Gal-T3、ヒト $\beta$ 3Gal-T4の各cDNAをpAMoに組み込んだ発現プラスミド (pAMo-3GT1、pAMo-3GT2、pAMo-3GT3、pAMo-3GT4) を造成した。

pAMo-3GT1は、特開平6-181759記載のプラスミドpUC119-WM1 (FERM BP-4011) を構築するために用いたプラスミドpAMoPRWM1と同じものである。

コントロールプラスミド (pAMo) または5種の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素発現プラスミド (pAMo-3GT1、pAMo-3GT2、pAMo-3GT3、pAMo-3GT4、またはpAMo-3GT5) を、実施例3に記載の方法と同様の方法によりNamalwa細胞に導入し、各形質転換細胞を得た。

実施例1の(2)と同様にして、該形質転換細胞から全RNAを抽出し、定量的RT-PCRを用いて、5種の $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子の転写量を測定した。

結果を第3表に示す。

第3表 アガラクトLNnTを基質とした時の $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素活性  
と  
各細胞における $\beta$ 3Gal-T転写物の発現量

細胞	%活性	$\beta$ 3Gal-T転写物の発現量 ( $\beta$ 3Gal-T/ $\beta$ -actin $\times 10^3$ )				
		$\beta$ 3Gal-T5	$\beta$ 3Gal-T1	$\beta$ 3Gal-T2	$\beta$ 3Gal-T3	$\beta$ 3Gal-T4
Namalwa-mock	<1	<0.01	<0.01	2.1	<0.01	1.4
Namalwa-3GT1	<1	<0.01	56	2.1	<0.01	1.4
Namalwa-3GT2	<1	<0.01	<0.01	38	<0.01	1.4
Namalwa-3GT3	<1	<0.01	<0.01	2.1	42	1.4
Namalwa-3GT4	<1	<0.01	<0.01	2.1	<0.01	43
Namalwa-3GT5	100	35	<0.01	2.1	<0.01	1.4
HCT-3GT5L	18	5	<0.01	<0.01	2.2	0.1
HCT-3GT5H	48	16	<0.01	<0.01	2.2	0.1
Colo205	40	3.5	<0.01	<0.01	0.05	4.6
SW1116	22	1.4	<0.01	0.3	0.6	3.2
HCT-15	<1	<0.01	<0.01	<0.01	2.2	0.1
Capan-2	23	1.2	<0.01	<0.01	1.9	2.3
MKN45	<1	<0.01	0.04	0.5	66	<0.01
PC-1	<1	<0.01	27	0.3	<0.01	0.2

発現プラスミドを導入した細胞では、対応する $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子の転写量が、ベクターのみを導入した細胞に比較して増加していることが確認された。

一方、該形質転換細胞を溶液〔20 mmol/l HEPES (pH 7.2)、2% TrironX-100〕に懸濁後、短時間超音波にかけて細胞溶解液を調製した。

該細胞溶解液のタンパク質濃度は、マイクロBCAタンパク質アッセイ試薬キット(PIERCE社)により測定した。

該細胞溶解液を用いて、 $\beta$ 1,3-ガラクトース転移酵素活性を測定した。

ビリジルアミノ化した糖鎖基質の調製や活性測定は、既知の方法〔特開平6-181759、特開平06-823021、J. Biol. Chem., 269, 14730-

14737(1994)) に準じて行った。

具体的には、活性測定は、 $10\mu\text{l}$ のアッセイ溶液〔 $14\text{mmol/l}$  HEPES (pH 7.4)、 $75\mu\text{mol/l}$  UDP-Gal (SIGMA社)、 $11\mu\text{mol/l}$   $\text{MnCl}_2$ 、 $0.01\%$  TrironX-100、 $25\mu\text{mol/l}$  ビリジルアミノ化糖鎖基質、上記細胞溶解液〕中で $37^\circ\text{C}$ 、2時間反応後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により生産物を同定することにより行った。

基質としては、アミノビリジンで蛍光標識したラクト-N-ネオテトラオース (Lacto-N-neotetraose,  $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ ; 以下、LNnT と略記する) を $\beta$ -ガラクトシダーゼ処理して末端のガラクトース残基を除去したもの (アガラクトLNnT,  $\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ ) を使用した。

アガラクトLNnTは、約 $60\text{nmol}$ のアミノビリジンで蛍光標識したLNnTに対し、 $100$ ミリユニットの $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製) を加え、 $37^\circ\text{C}$ で16時間反応後、 $100^\circ\text{C}$ で5分間の熱処理により $\beta$ -ガラクトシダーゼを失活させることにより調製した。

スタンダードとしては、アミノビリジンで蛍光標識したLNnTまたはアミノビリジンで蛍光標識したラクト-N-テトラオース (Lacto-N-tetraose,  $\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$ ; 以下、LNTと略記する) を用いた。LNnTおよびLNTはオックスフォード・グライコシステムズ社から購入した。オリゴ糖の蛍光標識は、常法 [Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)] に従って行った。

UDP-Gal (糖供与体) を含むアッセイ溶液と含まないアッセイ溶液を用いて反応を行った後、HPLCで解析し、UDP-Galを含むアッセイ溶液でのみ出現するピークを生成物とした。

反応が終了したアッセイ溶液は、 $100^\circ\text{C}$ で3分間処理後、 $10,000\times g$ で5分間遠心して上清を取得し、その一部をHPLCに供した。HPLCは、TSK-gel ODS-80Tsカラム ( $4.6\times 300\text{mm}$ ; 東ソー社製) を使用し、溶出液として $0.02\text{mol/l}$  酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.

0) を用い、溶出温度 25℃、流速 1 ml/分の条件で行った。

生成物の検出は、蛍光スペクトルフォトメーター FP-920 (日本分光社製) を用いて行った (励起波長 320 nm、放射波長 400 nm)。

生成物の同定は、スタンダードの糖鎖と溶出時間が一致することを指標とした。

生成物の定量は、アミノピリジル化したラクトースをスタンダードとして用い、蛍光強度を比較することにより行った。

ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}5$  の活性を 100 とした時の、各  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素の相対活性を第 3 表に示す。

ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}5$  を発現させた細胞では明らかな  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT 合成活性) が検出されたが、他の  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素を発現させた細胞では活性は検出されなかった。なお、コントロールプラスミド (pAMo) を導入した細胞でも活性は検出されなかった。

各  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素発現プラスミドを導入した細胞において、各  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素転写物は同程度発現していることから (第 3 表)、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}5$  の GlcNAc  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT 合成活性) は他の GlcNAc  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素 (ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}1$ 、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}2$ 、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}3$ ) に比較して強いことが判明した。なお、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}4$  に関しては、GlcNAc  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性はなく、GalNAc  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素活性を有することが知られている。

以上の結果、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}5$  は GlcNAc  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素であることが証明された。また、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}5$  の活性は他の GlcNAc  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転移酵素 (ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}1$ 、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}2$ 、ヒト  $\beta 3 \text{Gal-T}3$ ) に比較して強いことから、LNT 等のタイプ 1 糖鎖の合成に有用であることが示された。

また、 $\beta 3 \text{Gal-T}5$  転写産物の発現量と GlcNAc  $\beta 1, 3$ -ガラクトース転



移酵素活性 (LNT合成活性) が相関するかを検討するために、実施例2で取得した $\beta 3Gal-T5$ 発現プラスミドを導入したHCT-15細胞 (HCT-3GT5LおよびHCT-3GT5H)、ならびに実施例1で使用した大腸癌細胞株 (Colo205、SW1116、HCT-15)、膵臓癌細胞株 (Capan-2)、胃癌細胞株 (MKN45) および肺癌細胞株 (PC-1) について、 $\beta 3Gal-T5$ 転写産物の発現量とGlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT合成活性) を測定した。

各細胞における $\beta 3Gal-T5$ 転写産物の発現量は、実施例1または実施例2の(7)で記載した方法を用いて行った。GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT合成活性) の測定は、上記の方法に従った。

結果を第3表に示す。

その結果、 $\beta 3Gal-T5$ 転写産物の発現量とGlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT合成活性) が相関することが判明した。例えば、HCT-3GT5Hにおける $\beta 3Gal-T5$ 転写物量は、HCT-3GT5Lの約3倍であったが、HCT-3GT5HにおけるGlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT合成活性) もHCT-3GT5Lの約3倍であった。

一方、PC-1では $\beta 3Gal-T1$ を多く発現していたが、GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT合成活性) は検出されなかった。また、MKN45では $\beta 3Gal-T3$ を多く発現していたが、GlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT合成活性) は検出されなかった。

以上の結果は、 $\beta 3Gal-T1$ および $\beta 3Gal-T3$ のGlcNAc  $\beta 1,3$ -ガラクトース転移酵素活性 (LNT合成活性) は、 $\beta 3Gal-T5$ に比較して弱いことを示しており、上記のNamalwa細胞を用いた結果と一致した。

#### 実施例4 $\beta 3Gal-T5$ 遺伝子の各種臓器での発現

実施例2の(7)と同様にして、RT-PCRを用いてヒト各組織 (脳、肺、食道、胃 (体)、胃 (洞)、空腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、子宮、抹消リンパ球) における $\beta 3Gal-T5$ 転写物の定量を行った。各組織における $\beta 3Gal-T5$ 遺伝子転写産物の量を、 $\beta$ -アクチンの転写産物の量を

1000とした時の相対値として表示した（第5図）。

$\beta 3 \text{Gal-T5}$  転写物は、胃（体）、胃（洞）、空腸、大腸、脾臓で有意に発現していることが明らかになった。また、脳、食道、腎臓、子宮でも少し発現がみられた。一方、肺、肝臓、脾臓、副腎、抹消リンパ球では発現はみられなかった。

#### 実施例5 $\beta 3 \text{Gal-T5}$ 染色体遺伝子の構造解析

現在、多くの機能未知のヒト染色体遺伝子の配列がデータベースに登録されている。したがって、本発明のポリペプチドをコードするヒトcDNAの配列と、データベースに登録されてるヒト染色体遺伝子の配列とを比較することにより、本発明のポリペプチドをコードするヒト染色体遺伝子を同定し、その構造を明らかにできる可能性がある。cDNAの配列と一致する染色体遺伝子配列が登録されていれば、cDNAの配列と染色体遺伝子の配列を比較することにより、本発明のポリペプチドをコードする染色体遺伝子のプロモーター領域、エクソンおよびイントロン構造を決定することができる。

$\beta 3 \text{Gal-T5}$  cDNAの塩基配列（配列番号2）とGenome Project Databaseに登録されているDNA配列を比較した結果、登録番号AF064860の配列の一部に、 $\beta 3 \text{Gal-T5}$  のcDNAの配列が含まれていたことより、 $\beta 3 \text{Gal-T5}$  染色体遺伝子はヒト染色体21q22.3に位置することが分かった。

$\beta 3 \text{Gal-T5}$  染色体遺伝子のプロモーター領域を明らかにする目的で、5' RACE法を用いて、Colo205細胞より $\beta 3 \text{Gal-T5}$  cDNAの5' 末端領域の取得を行った。5' RACE法はキット（GIBCO社製5' RACEシステム、バージョン2.0）に従って行った。

Colo205細胞由来のmRNA（1  $\mu\text{g}$ ）を鋳型、配列番号22および配列番号23に示す配列を有する2種の合成DNAをプライマーとして、まず一本鎖cDNAを合成した。合成後、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて、該cDNAの3' 末端にオリゴdCを付加した後、キットに添付されているdGテイルを有する合成DNAをフォワードプライマー、配列

番号24に示す配列を有する合成DNAをリバースプライマーとして、PCRを行った。

PCRは、97℃で11分間の加熱後、94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で2分間からなる反応を1サイクルとして、42サイクル繰り返す条件で行った。

増幅断片をHindIIIとSpeIで消化後、pBluescript SK(-)のHindIII-SpeI間にサブクローン化した。このようにして得られた5種のプラスミドについて塩基配列を決定した結果、Colo205細胞における $\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子の転写開始点は上記の登録番号AF064860の配列上85153番目の塩基であることが明らかになった。

したがって、これより上流の領域は、少なくともColo205細胞において機能しているプロモーター領域であることが判明した。

$\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子のプロモーター領域（転写制御領域を含む）は、転写開始点の上流の5kb（配列番号3で表される塩基配列の1～5000番）と推定される。

転写開始点の上流1kb（配列番号3で表される塩基配列の4001～5000番）について、転写因子の結合配列のコンセンサス配列の存在について、TFSEARCH (transcription factor search) プログラム (Akiyama, Y., <http://www.rwcp.or.jp/lab/pdappl/papia.html>) を用いて解析した。

転写開始点の上流にTATAボックスは存在しなかったが、転写開始点の上流150bp中に、2つのCdxAサイト、1つのAP-1サイト、1つのMZF-1(myeloid zinc finger 1 protein)サイトが存在すると推定された。

該領域の下流にレポーター遺伝子を連結したプラスミドを、 $\beta$ 3Gal-T5を発現している細胞に導入し、レポーター遺伝子が発現するかどうかを検討することにより、プロモーター領域を実験的に特定することもできる。

$\beta$ 3Gal-T5染色体遺伝子のエクソン領域とイントロン領域をさらに詳しく解析するために、PCR法を用いて $\beta$ 3Gal-T5 cDNAのアイソフ

ォームが存在するかどうかについて検討した。

実施例 1 で調製した Colo205 細胞由来の 1 本鎖 c D N A を鋳型、配列番号 2 2 と配列番号 2 5 に示す配列を有する 2 種の合成 D N A をプライマーとして、P C R を行った。

P C R は、9 7 °C で 1 1 分間の加熱後、9 4 °C で 1 分間、5 5 °C で 1 分間、7 2 °C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして、4 2 サイクル繰り返す条件で行った。

増幅断片を H i n d I I I で消化後、pBluescript SK(-) の H i n d I I I サイトにサブクローン化した。このようにして得られたプラスミドについて塩基配列を決定した結果、Colo205 細胞において少なくとも 5 種類の  $\beta$  3 G a l - T 5 c D N A アイソフォームが存在することが明らかとなった (第 6 図)。

各アイソフォームに相当する P C R 増幅断片の量を比較することにより、各アイソフォームの発現量の比を求めたところ、アイソフォーム 1 が 5 0 %、アイソフォーム 2 が 5 0 %、アイソフォーム 3、4、5 はそれぞれ 1 % 以下であった。

各アイソフォームに相当する P C R 増幅断片は、増幅断片の大きさと制限酵素処理 (X b a I 処理または B s m I 処理) により特定した。

以上の結果、 $\beta$  3 G a l - T 5 染色体遺伝子は 4 つのエクソンと 3 つのイントロンよりなることが明らかとなった。 $\beta$  3 G a l - T 5 染色体遺伝子のプロモーター領域 (転写制御領域を含む) と  $\beta$  3 G a l - T 5 染色体遺伝子の配列を合わせて配列番号 3 に示した。 $\beta$  3 G a l - T 5 染色体遺伝子のプロモーター領域 (転写制御領域を含む) の配列は、配列番号 3 の 1 ~ 5 0 0 0 b p である。 $\beta$  3 G a l - T 5 染色体遺伝子の配列は、配列番号 3 の 5 0 0 1 ~ 1 0 5 6 2 b p である。 $\beta$  3 G a l - T 5 染色体遺伝子のエクソンとイントロンの位置を配列番号 3 の番号を用いて第 4 表に示した。第 4 表中において、大文字で示した塩基配列はエクソン部分、小文字で示した塩基配列はイントロン部分を示している。

$\beta$ 3Gal-T5 染色体遺伝子の構造（エクソン領域とイントロン領域の位置と配列）と染色体上の位置、ならびに  $\beta$ 3Gal-T5 染色体遺伝子のプロモーター領域の位置と配列は、本研究によって  $\beta$ 3Gal-T5 cDNA の構造と機能が明らかになることにより、初めて特定できたものである。

第4表  $\beta$ 3Gal-T5 染色体遺伝子のエクソン-イントロン結合部位

エクソン 番号	配列番号3中の 塩基配列番号	長さ (bp)	スプライスアクセプタ ーサイトの配列	スプライスドナー サイトの配列
exon1	5001-5273	273	-----	CTGTCACGgtatttcc
exon1'	5001-5140	140	-----	CCAAGCAGgtttctgg
exon2	5459-5567	109	ctctctagAGAACCCT	GTTTGGAGgtagggct
exon3	7427-7586	160	tttcctagTGATTCCT	AGCAAAAgtgagtta
exon4	8234-10562	2329	cctttcagATGGCTTT	

#### 産業上の利用可能性

本発明により、大腸癌細胞または膵臓癌細胞等の消化器系癌細胞において、タイプ1糖鎖の合成に関与する $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有する新規ポリペプチド、該ポリペプチドの製造法、該ポリペプチドをコードするDNA、該DNAが組み込まれた組換え体ベクター、該組換え体ベクターを保有する形質転換体、該ポリペプチドを認識する抗体、該抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法および免疫染色法、該ポリペプチドを用いたタイプ1糖鎖含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該組換え体ベクターを保有する形質転換体を用いたタイプ1糖鎖含有糖鎖および該糖鎖を含有する複合糖質の製造法、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質のスクリーニング法、該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質のスクリーニング法、該DNAあるいは該抗体を用いた大腸癌、膵臓癌、胃癌等の疾患の診断法、該DNA、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる物質あるいは該ポリペプチドの有する活性を変動させる物質を用いた大腸癌、膵臓癌、胃癌等の疾患の治療法を提供することができる。

## 「配列表フリーテキスト」

配列番号 4－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 5－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 6－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 7－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 8－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 9－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 10－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 11－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 12－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 13－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 14－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 15－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 16－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 17－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 18－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 19－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 20－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 21－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 22－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 23－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 24－人工配列の説明：合成DNA

配列番号 25－人工配列の説明：合成DNA

請求の範囲

1. シアリルルイス a 糖鎖を発現している大腸癌細胞に存在する、シアリルルイス a 糖鎖の合成に関与する  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド。

2. 以下の (a)、(b) および (c) からなる群より選ばれるポリペプチド。

(a) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 31～310 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチド

(c) (a) または (b) のポリペプチドの有するアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Gal  $\beta$  1-3GlcNAc 構造を合成可能な  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチド

3.  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性が、糖鎖の非還元末端に存在する N-アセチルグルコサミン残基に  $\beta$  1, 3 結合でガラクトースを転移する活性である、請求項 1 または 2 記載のポリペプチド。

4.  $\beta$  1, 3-ガラクトース転移酵素活性が、GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Glc の非還元末端に存在する N-アセチルグルコサミン残基、または N-アセチルグルコサミン単糖に  $\beta$  1, 3 結合でガラクトースを転移する活性である、請求項 1 または 2 記載のポリペプチド。

5. 以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群より選ばれる DNA。

(a) 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列の 402～1331 番目の塩基配列を有する DNA

(c) 配列番号 2 で表される塩基配列の 492～1331 番目の塩基配列を

有するDNA

(d) (a) ~ (c) いずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、かつGal $\beta$ 1-3GlcNAc構造を合成可能な $\beta$ 1, 3-ガラクトース転移酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNA

6. 請求項5記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

7. 組換え体DNAが、プラスミドpAM $\alpha$ -3GT5またはプラスミドpBS-3GT5 (FERM BP-6645) である、請求項6記載の組換え体DNA。

8. 請求項5に記載のDNA、請求項6記載の組換え体DNA、または請求項7記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

9. 形質転換体が、微生物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、非ヒトトランスジェニック動物およびトランスジェニック植物からなる群より選ばれる形質転換体である、請求項8記載の形質転換体。

10. 微生物が、Escherichia属に属する微生物である、請求項9記載の形質転換体。

11. 動物細胞が、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、CHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリサル腎臓細胞、Namalwa細胞、Namalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞およびヒト白血病細胞からなる群より選ばれる動物細胞である、請求項9記載の形質転換体。

12. 昆虫細胞が、Spodoptera frugiperdaの卵巢細胞、Trichoplusia niの卵巢細胞およびカイコの卵巢細胞からなる群より選ばれる昆虫細胞である、請求項9記載の形質転換体。

13. 請求項1~4のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。



14. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ポリペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

15. 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項 14 記載の製造法。

16. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA をベクターに組み込んで得られる組換え体 DNA を保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ポリペプチドを該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

17. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA を用い、in vitroでの転写・翻訳系により該ポリペプチドを合成することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

18. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを酵素源として用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、

ii) N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

iii) N-アセチルグルコサミン残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

(c) ウリジン-5'-ニリン  
水性媒体中に、該受容基質の N-アセチルグルコサミンまたは N-アセチルグルコサミン残基に  $\beta$  1, 3 結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

19. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリペ

用い、

(a) 該酵素源、

(b) i) グルコース、

ii) グルコース残基を非還元末端に有するオリゴ糖および

iii) グルコース残基を糖鎖の非還元末端に有する複合糖質からなる群より選ばれる受容基質、および

(c) ウリジン-5'-ニリン酸ガラクトースを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に、該受容基質のグルコースまたはグルコース残基に $\beta$ 1, 3結合でガラクトースが付与された反応産物を生成・蓄積させ、該水性媒体中より該反応産物を採取することを特徴とする、該反応産物の製造法。

20. 請求項9記載の微生物、動物細胞、植物細胞および昆虫細胞由来の形質転換体からなる群より選ばれる形質転換体を培養液中で培養し、該培養物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該培養物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

21. 請求項9記載の非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該動物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該動物中より該糖鎖または該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

22. 請求項9記載のトランスジェニック植物を栽培し、該植物中に、ガラクトースが $\beta$ 1, 3結合でN-アセチルグルコサミン、N-アセチルグルコサミン残基、グルコースまたはグルコース残基に付加した構造を有する糖鎖または該糖鎖を含有する複合糖質を生成・蓄積させ、該植物中より該糖鎖または

該複合糖質を採取することを特徴とする、該糖鎖または該複合糖質の製造法。

23. 複合糖質が、糖タンパク質、糖脂質、プロテオグリカン、グリコペプチド、リボ多糖、ペプチドグリカン、およびステロイド化合物に糖鎖が結合した配糖体からなる群より選ばれる複合糖質である、請求項18～22のいずれかに記載の製造法。

24. 生成・蓄積が動物のミルク中であることを特徴とする、請求項21記載の製造法。

25. 請求項1～4のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAまたは該DNAの断片を用い、ハイブリダイゼーション法により、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

26. 請求項5に記載のDNAまたは配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド誘導体からなる群より選ばれるDNA。

27. オリゴヌクレオチド誘導体が、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN3' - P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5チアゾールウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、DNA中のリボースが2' - O - プロピルリボースで置換された誘

導体オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド中のリボースが2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体からなる群より選ばれるオリゴヌクレオチド誘導体である、請求項26記載のDNA。

28. 配列番号20または21で表される塩基配列を有するDNA。

29. 請求項26～28のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチドを用い、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法により、請求項1～4のいずれかに記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を定量する方法。

30. 請求項25または29記載の方法を用いた癌または癌転移の検出法。

31. 請求項5、26～28記載のDNAおよび配列番号2または3で表される塩基配列を有するDNAから得られるDNAを用い、請求項1～4のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNAの転写またはmRNAの翻訳を抑制する方法。

32. 請求項1～4のいずれか1項に記載のポリペプチドを認識する抗体。

33. 請求項32記載の抗体を用いる、請求項1～4のいずれかに記載のポリペプチドの免疫学的検出法。

34. 請求項32記載の抗体を用い、請求項1～4のいずれかに記載のポリペプチドを検出することを特徴とする免疫組織染色法。

35. 請求項32記載の抗体を含有する免疫組織染色剤。

36. 請求項32記載の抗体を含有する、癌または癌転移の診断薬。

37. 請求項1～4のいずれか1項に記載のポリペプチドと被験試料とを接触させることを特徴とする、該ポリペプチドの有する活性を変動させる化合物のスクリーニング法。

38. 請求項1～4のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、抗シアリルルイスa抗体、抗ルイスa抗体、抗ルイスb抗体または抗シアリルルイスc抗体を用い、シアリルルイスa糖鎖、ルイスa糖鎖、ルイスb糖鎖またはシアリルルイスc糖鎖含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリ

ーニング法。

39. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させ、請求項 32 記載の抗体を用い、該ポリペプチド含量を測定することを特徴とする、該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を変動させる化合物のスクリーニング法。

40. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の転写を司るプロモーター DNA。

41. プロモーター DNA が、小腸細胞、大腸細胞、膵臓細胞、胃細胞、大腸癌細胞、膵癌細胞および胃癌細胞からなる群より選ばれる細胞で機能しているプロモーターである、請求項 40 記載のプロモーター DNA。

42. プロモーター DNA が、ヒトまたはマウス由来のプロモーター DNA である、請求項 40 または 41 記載のプロモーター DNA。

43. プロモーター DNA が、配列番号 3 で表される塩基配列の 1～5000 番目の塩基配列中の連続する 50～5000 bp の DNA 配列を有する、請求項 40～42 のいずれか 1 項に記載のプロモーター DNA。

44. 請求項 40～43 のいずれか 1 項に記載のプロモーター DNA および該プロモーター DNA の下流に連結させたレポーター遺伝子を含有するプラスミドを用いて動物細胞を形質転換し、該形質転換体と被験試料とを接触させ、該レポーター遺伝子の翻訳産物の含量を測定することを特徴とする、該プロモーターによる転写の効率を変動させる化合物のスクリーニング法。

45. レポーター遺伝子が、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、エクオリン遺伝子およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子より選ばれる遺伝子である、請求項 44 記載のスクリーニング法。

46. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA を欠損または変異させたノックアウト動物。

47. ノックアウト動物がマウスである、請求項 4 6 記載のノックアウト動物。

第1図

A

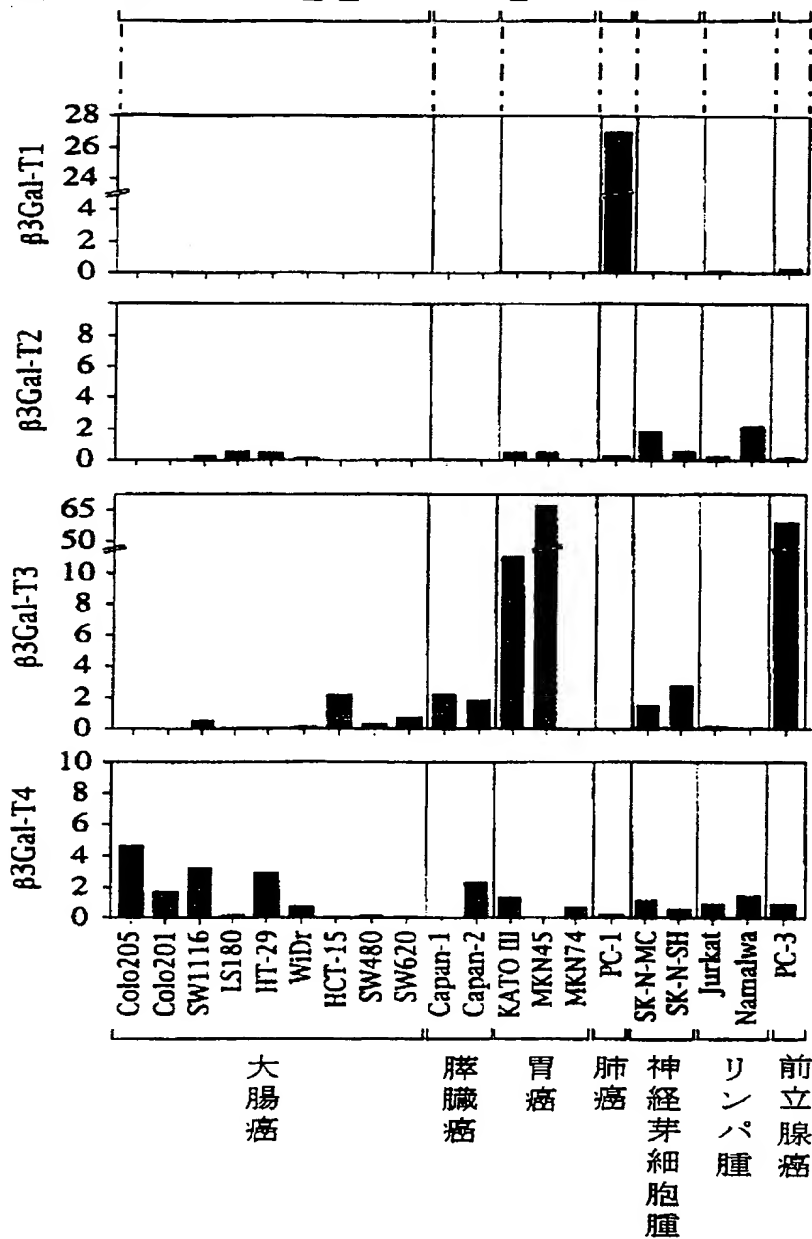
## Flow cytometry

sLe<sup>a</sup>(19-9)Le<sup>a</sup>(7LE)Le<sup>b</sup>(TT42)

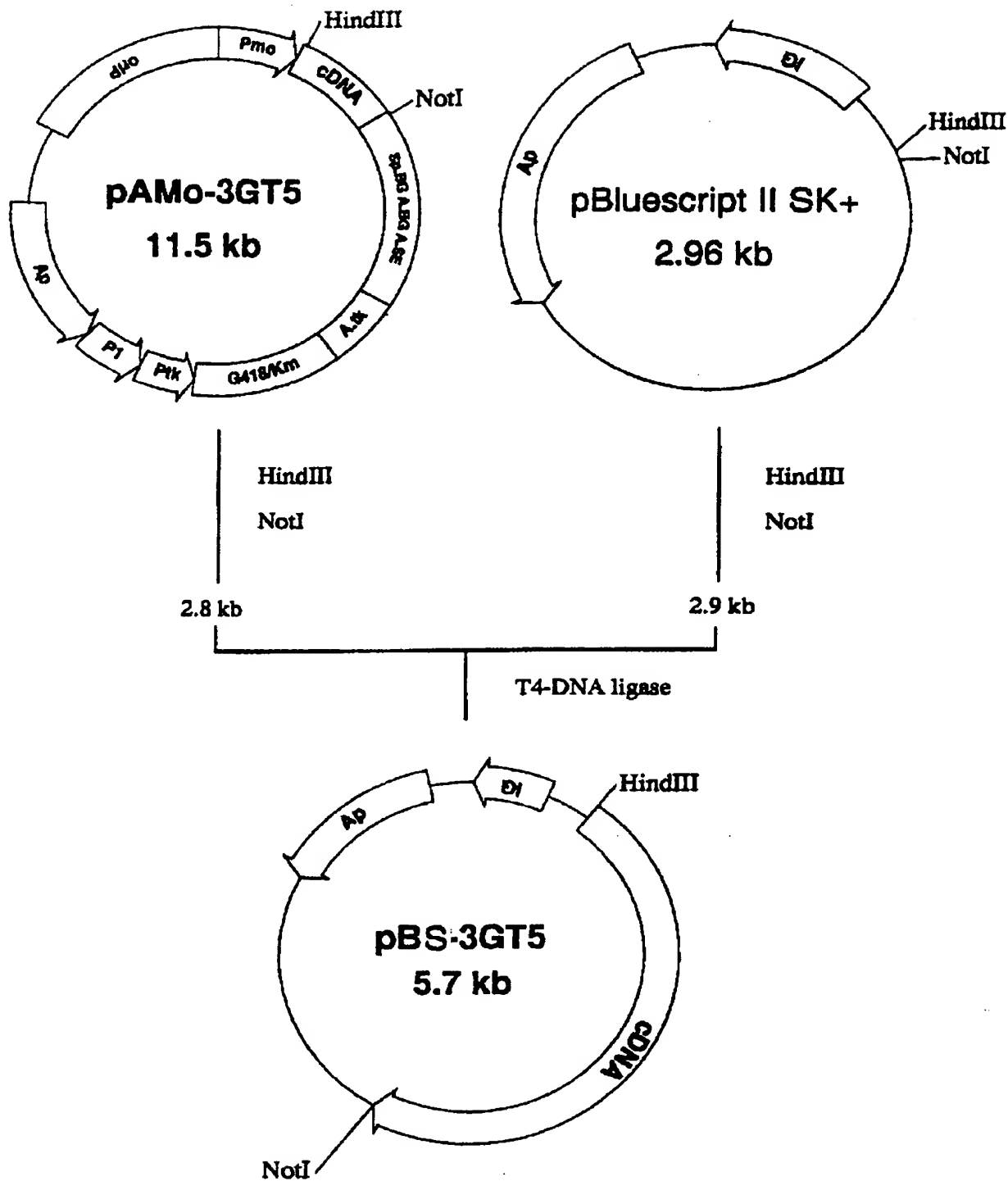
##	##	##	+	±	±	-	-	-	-	##	±	-	-	-	NT	NT	NT	-	-
##	##	##	±	±	±	±	±	+	-	-	±	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-
##	##	##	+	+	±	±	+	-	-	-	±	-	-	-	NT	NT	NT	NT	-

B

β 3 Gal-T 転写産物の相対量  
(β3Gal-T/β-actin × 10<sup>3</sup>)



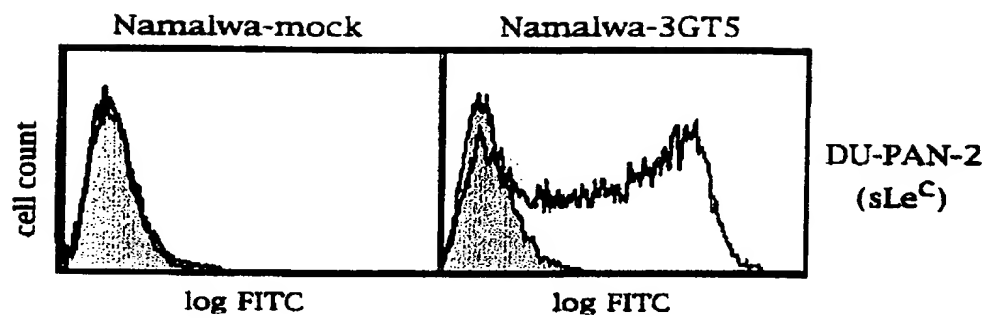
第2図



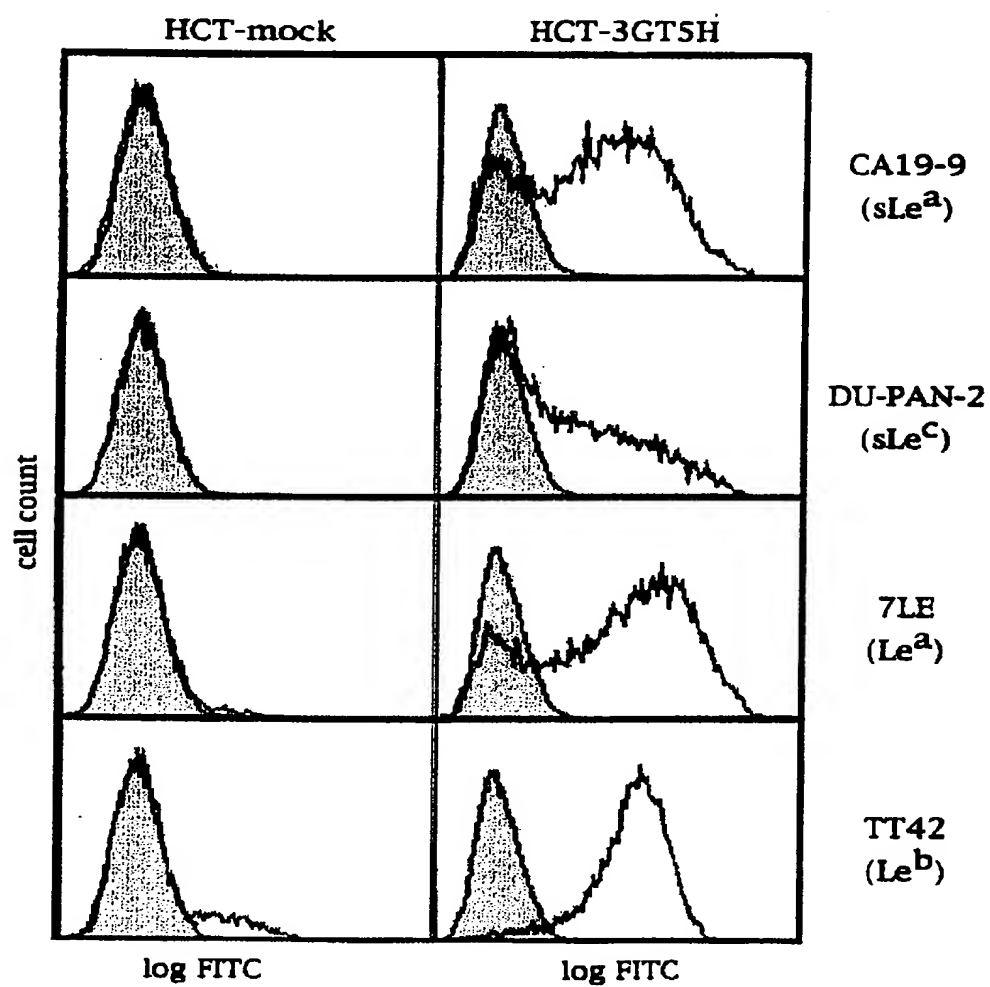


## 第3図

A

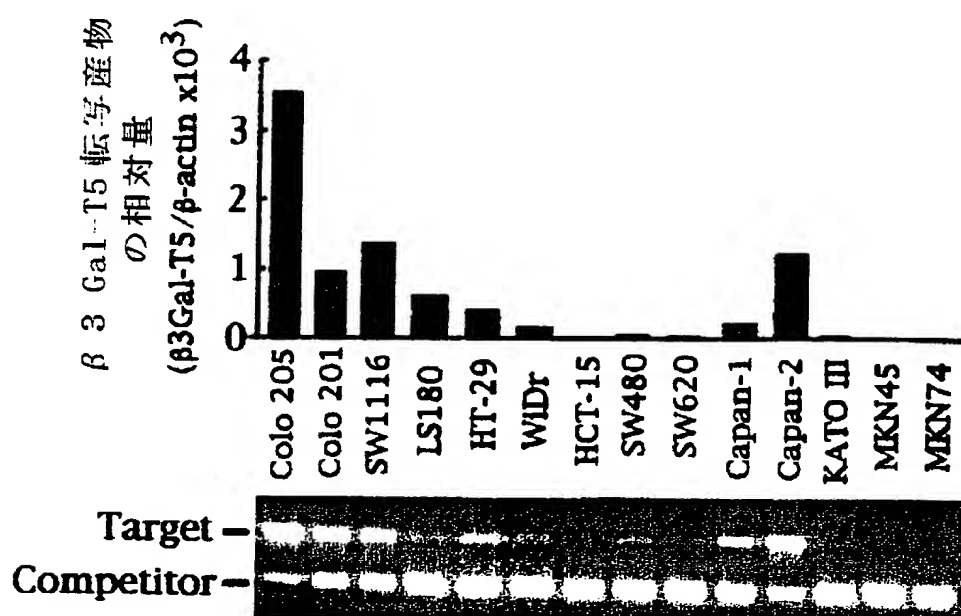


B

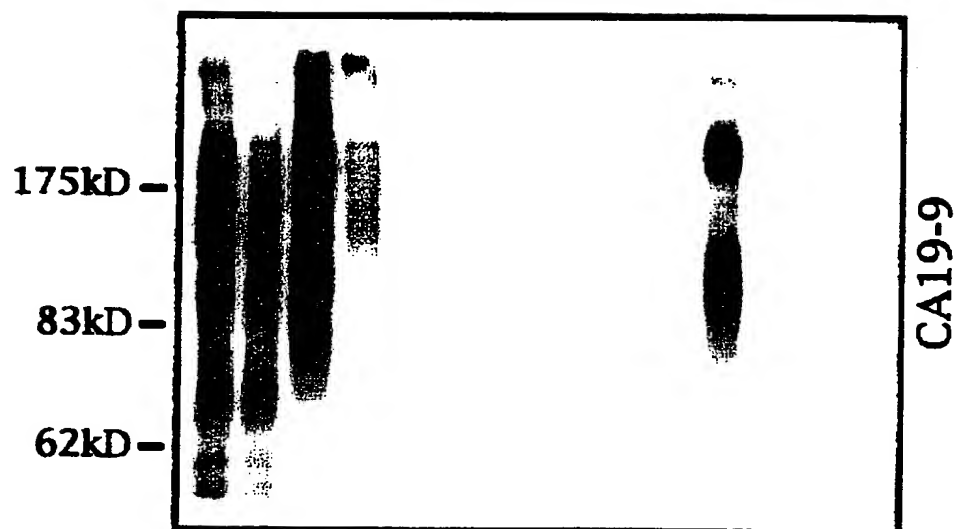


第4図

A

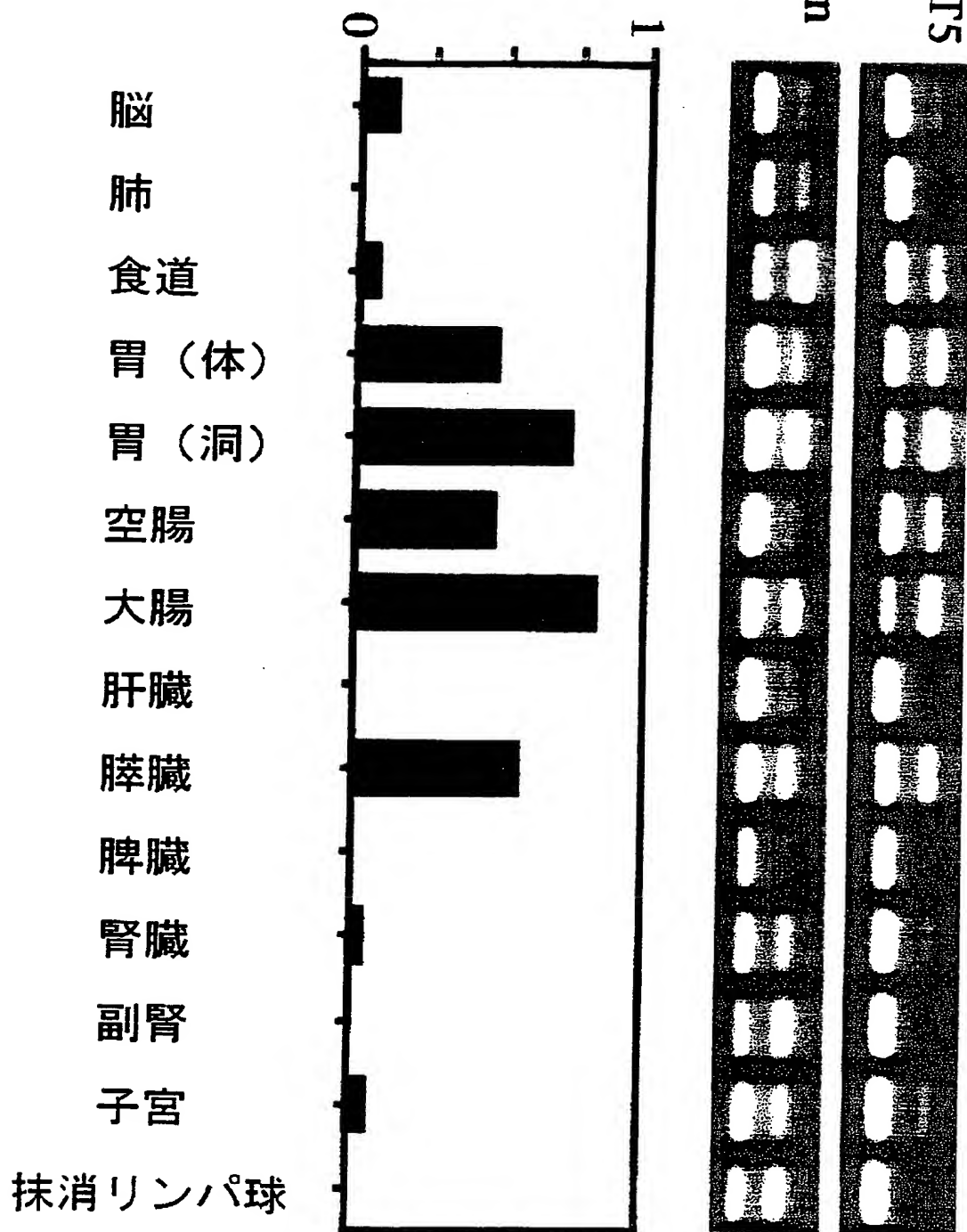


B



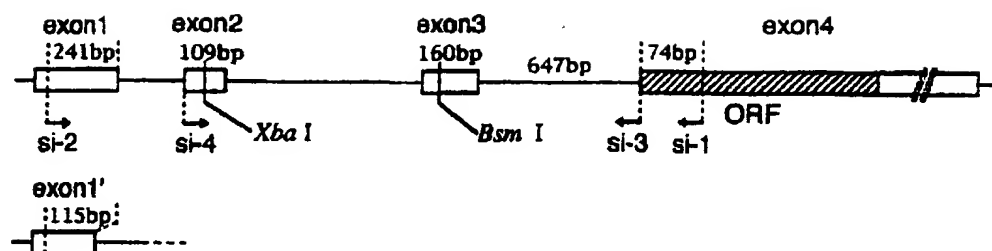
第5図

$\beta$  3 Gal-T5 転写産物  
の相対量  
( $\beta$ 3Gal-T5/ $\beta$ -actin  $\times 10^3$ )

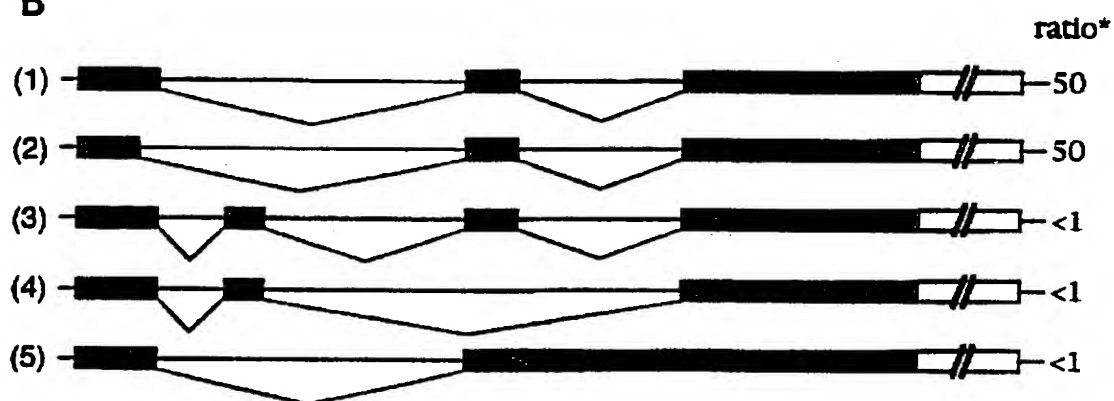


第 6 図

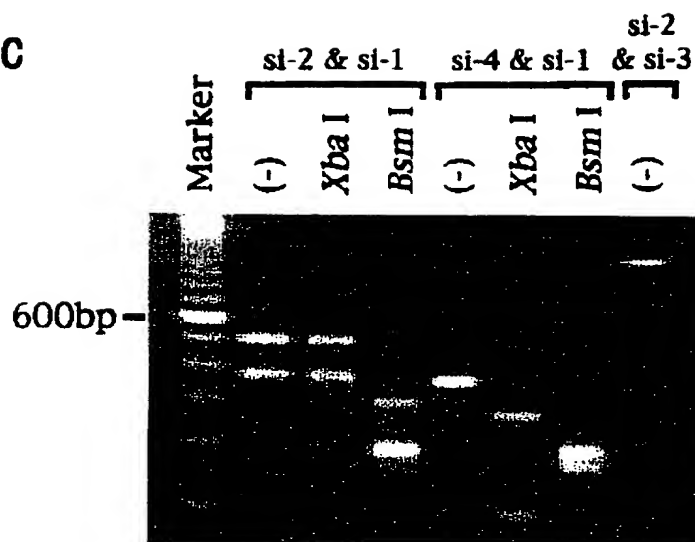
A



B



C



配列表SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> NOVEL PEPTIDE

<130> 11192W01

<140>

<141>

<150> JP 99/47571

<151> 2000-02-25

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 310

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Ala	Phe	Pro	Lys	Met	Arg	Leu	Met	Tyr	Ile	Cys	Leu	Leu	Val	Leu
1				5					10					15	

Gly	Ala	Leu	Cys	Leu	Tyr	Phe	Ser	Met	Tyr	Ser	Leu	Asn	Pro	Phe	Lys
		20						25					30		

Glu	Gln	Ser	Phe	Val	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gly	Asn	Phe	Leu	Lys	Leu	Pro
		35					40					45			

Asp	Thr	Asp	Cys	Arg	Gln	Thr	Pro	Pro	Phe	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Thr
	50					55					60				

Ser	Ser	His	Lys	Gln	Leu	Ala	Glu	Arg	Met	Ala	Ile	Arg	Gln	Thr	Trp
65					70					75					80

Gly	Lys	Glu	Arg	Met	Val	Lys	Gly	Lys	Gln	Leu	Lys	Thr	Phe	Phe	Leu
				85						90					95

Leu Gly Thr Thr Ser Ser Ala Ala Glu Thr Lys Glu Val Asp Gln Glu  
 100 105 110  
 Ser Gln Arg His Gly Asp Ile Ile Gln Lys Asp Phe Leu Asp Val Tyr  
 115 120 125  
 Tyr Asn Leu Thr Leu Lys Thr Met Met Gly Ile Glu Trp Val His Arg  
 130 135 140  
 Phe Cys Pro Gln Ala Ala Phe Val Met Lys Thr Asp Ser Asp Met Phe  
 145 150 155 160  
 Ile Asn Val Asp Tyr Leu Thr Glu Leu Leu Lys Lys Asn Arg Thr  
 165 170 175  
 Thr Arg Phe Phe Thr Gly Phe Leu Lys Leu Asn Glu Phe Pro Ile Arg  
 180 185 190  
 Gln Pro Phe Ser Lys Trp Phe Val Ser Lys Ser Glu Tyr Pro Trp Asp  
 195 200 205  
 Arg Tyr Pro Pro Phe Cys Ser Gly Thr Gly Tyr Val Phe Ser Gly Asp  
 210 215 220  
 Val Ala Ser Gln Val Tyr Asn Val Ser Lys Ser Val Pro Tyr Ile Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Asp Val Phe Val Gly Leu Cys Leu Glu Arg Leu Asn Ile Arg  
 245 250 255  
 Leu Glu Glu Leu His Ser Gln Pro Thr Phe Phe Pro Gly Gly Leu Arg  
 260 265 270  
 Phe Ser Val Cys Leu Phe Arg Arg Ile Val Ala Cys His Phe Ile Lys  
 275 280 285  
 Pro Arg Thr Leu Leu Asp Tyr Trp Gln Ala Leu Glu Asn Ser Arg Gly  
 290 295 300  
 Glu Asp Cys Pro Pro Val  
 305 310

<210> 2  
 <211> 2775  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (402)..(1331)

<400> 2  
 gtgaattcct ctttctctgc tggagctggg atattcttct tctcctgccc ttggacatca 60  
 gagctgcagg ctctctggcc tttggaccgg aggatttata ccaagcaggt ttctgggttc 120  
 tcaggccttt ggccttggac tgatagttac accattggca tatctgggtc tgaggctctt 180  
 ggtcttggac tgagccacac tcctggcacc ccagcgtctc cagcttgcac ggcctgtcac 240  
 gtgattcctg tcagaatcac catttttggg aaacaaacca agcccagaac ctgataatta 300  
 tggagcattc tacactgaca gttctttgag acaaatttcc tcttggcatt tacactgtgg 360  
 ctttagcttt caaaccagag gttcctctta cccagcaaaa a atg gct ttc ccg aag 416  
 Met Ala Phe Pro Lys  
 1 5  
 atg aga ttg atg tat att tgc ctt ctg gtt ctg ggg gct ctt tgt ttg 464  
 Met Arg Leu Met Tyr Ile Cys Leu Leu Val Leu Gly Ala Leu Cys Leu  
 10 15 20  
 tat ttt agc atg tac agt cta aat cct ttc aaa gaa cag tcc ttt gtt 512  
 Tyr Phe Ser Met Tyr Ser Leu Asn Pro Phe Lys Glu Gln Ser Phe Val  
 25 30 35  
 tac aag aaa gac ggg aac ttc ctt aag ctc cca gat aca gac tgc agg 560  
 Tyr Lys Lys Asp Gly Asn Phe Leu Lys Leu Pro Asp Thr Asp Cys Arg  
 40 45 50  
 cag aca cct ccc ttc ctc gtc ctg ctg gtg acc tca tcc cac aaa cag 608  
 Gln Thr Pro Pro Phe Leu Val Leu Leu Val Thr Ser Ser His Lys Gln  
 55 60 65

ttg gct gag cgc atg gcc atc cgg cag acg tgg ggg aaa gag agg atg	656
Leu Ala Glu Arg Met Ala Ile Arg Gln Thr Trp Gly Lys Glu Arg Met	
70 75 80 85	
gtg aag gga aag cag ctg aag aca ttc ttc ctc ctg ggg acc acc agc	704
Val Lys Gly Lys Gln Leu Lys Thr Phe Phe Leu Leu Gly Thr Thr Ser	
90 95 100	
agt gca gcg gaa acg aaa gag gtg gac cag gag agc cag cga cac ggg	752
Ser Ala Ala Glu Thr Lys Glu Val Asp Gln Glu Ser Gln Arg His Gly	
105 110 115	
gac att atc cag aag gat ttc cta gac gtc tat tac aat ctg acc ctg	800
Asp Ile Ile Gln Lys Asp Phe Leu Asp Val Tyr Tyr Asn Leu Thr Leu	
120 125 130	
aag acc atg atg ggc ata gaa tgg gtc cat cgc ttt tgt cct cag gcg	848
Lys Thr Met Met Gly Ile Glu Trp Val His Arg Phe Cys Pro Gln Ala	
135 140 145	
gcg ttt gtg atg aaa aca gac tca gac atg ttc atc aat gtt gac tat	896
Ala Phe Val Met Lys Thr Asp Ser Asp Met Phe Ile Asn Val Asp Tyr	
150 155 160 165	
ctg act gaa ctg ctt ctg aag aaa aac aga aca acc agg ttt ttc act	944
Leu Thr Glu Leu Leu Leu Lys Lys Asn Arg Thr Thr Arg Phe Phe Thr	
170 175 180	
ggc ttc ttg aaa ctc aat gag ttt ccc atc agg cag cca ttc agc aag	992
Gly Phe Leu Lys Leu Asn Glu Phe Pro Ile Arg Gln Pro Phe Ser Lys	
185 190 195	
tgg ttt gtc agt aaa tct gaa tat ccg tgg gac agg tac cca cca ttc	1040
Trp Phe Val Ser Lys Ser Glu Tyr Pro Trp Asp Arg Tyr Pro Pro Phe	
200 205 210	
tgc tcc ggc acc ggc tac gtg ttt tct ggc gac gtg gcg agt cag gtg	1088
Cys Ser Gly Thr Gly Tyr Val Phe Ser Gly Asp Val Ala Ser Gln Val	
215 220 225	
tac aat gtc tcc aag agc gtc cca tac att aaa ctg gaa gac gtg ttt	1136
Tyr Asn Val Ser Lys Ser Val Pro Tyr Ile Lys Leu Glu Asp Val Phe	
230 235 240 245	



gtg ggg ctc tgc ctc gaa agg ctg aac atc aga ttg gag gag ctc cac 1184  
 Val Gly Leu Cys Leu Glu Arg Leu Asn Ile Arg Leu Glu Glu Leu His  
                   250                                  255                                  260

tcc cag ccg acc ttt ttt cca ggg ggc tta cgc ttc tcc gta tgc ctc 1232  
 Ser Gln Pro Thr Phe Phe Pro Gly Gly Leu Arg Phe Ser Val Cys Leu  
                   265                                  270                                  275

ttc agg agg atc gtg gcc tgc cac ttc atc aag cct cgg act ctc ttg 1280  
 Phe Arg Arg Ile Val Ala Cys His Phe Ile Lys Pro Arg Thr Leu Leu  
                   280                                  285                                  290

gac tac tgg cag gct cta gag aat tcc cgg ggg gaa gat tgt ccg cct 1328  
 Asp Tyr Trp Gln Ala Leu Glu Asn Ser Arg Gly Glu Asp Cys Pro Pro  
                   295                                  300                                  305

gtc tgaggggagc ccagaggcac atccggacaa gtttcagata acccgtgggg 1381  
 Val  
 310

atagtttttg ctagattttg gaagaggggg cgggacagag gatgctgttc ttcagtgtctg 1441

aaatccacgc cagaatgtcg gtgttcatga agtcactgat tagttccac ttggtgcccc 1501

aggcaataat aggcccgtct cttgggcacg cacactcttc atactaagtg ttgacatac 1561

acctggattt ttgcatttca ggggtcagta tcctatgaca tgatgggtgt taccatccta 1621

attttacagg caaggacaca gcagctgcga gaggtacaga aacttgtccc aaggctcaca 1681

gccagtaggc ataggagcgg gaatgaaaat cgagcactgt cagaatctgg tgggcagccc 1741

ctgacttgaa cactccac gtgctgcctc ccttaggagg ggacactgat gatgaggtct 1801

cggagccggc atccttccat cctgtcgag tccctccac ctcagctccc agtccttgtg 1861

ctttttggag ctaagcctgg gatgacaaa ttcaccccag ctccttcatt cacagggctg 1921

gatgtagctg ggattgagtc catgttatcg gctcggtact caacacaacc caagtttcat 1981

ccgaggaaat gtccccgcag tggatgcagc tcacatgtg aggaacaccc agctctggac 2041

agagttctta taaatgtata aattaggctc agaaaccact gcattctgac ctgctgtaca 2101  
gactgcccac actgctgacc tgcctagcga gcaggacatc cttctgagc catctgctgc 2161  
tctctcattt catcacccca actgtccctt gtttttgatc aatggggacc agccactgcc 2221  
ccaggagcac tttagggtc tcagttcaaa ctgaaggaca gttgaactca gatggggttc 2281  
atgtgggatt ctgggagctt tctgggaatt cagttggagt caagtcagga tgctctcaag 2341  
gacccctcgg gctcagagcc ctaaagtggg ccctggtgaa gcagggtggt cctgcgtcca 2401  
cttcccaagc ctgagccaag ctcattctca ttgaatgtct catttgccg aggaacaact 2461  
gaactttgtg gtttgctgtt tagccttcag tttgctccgc tgcctcctac ccagaggttt 2521  
gtgcgagcct gtgttcgagg gttgtataaa accaaggtagc ttggttagtt ttgccattc 2581  
agccatggtc acgtgacatg caaagtaatc ttgctcctaa ttatagaaat gatttttctt 2641  
ttaatttttt actttaccag actttacttt gtactcagag aagaggcctc acatggctgt 2701  
gtcacatata aatgttggac taaactctta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2761  
aaaaaaaaaa aaaa 2775

<210> 3

<211> 10562

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(5000)

<220>

<221> exon

<222> (5001)..(5140)

<220>

<221> exon

<222> (5001)..(5273)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; exon

&lt;222&gt; (5459)..(5567)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; exon

&lt;222&gt; (7427)..(7586)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; exon

&lt;222&gt; (8234)..(10562)

&lt;400&gt; 3

cgccctctggc aaggtagacc ttgaaggcaa aactgagttg aggtttgtta ggacggaaat	60
aattactgct gggcatgcag cacttcccaa ccgttctgtg aggcaggcag tgttattgcc	120
agtttggcac aagggcacag gtgtagaaca cgtaagtgcc ctgggccgtg ctacaccacc	180
actgtgtttg agctgagatg tgaaccaggg ccttctgatt ccaaattcct cattcctttc	240
atcctagcag gctgcctgcg gttagcagaa ggggactcct gtatctgctc tgcagcttct	300
tcagctgatt tataatggaa aacagagtag atattgattt ggcaattagt gaaatattat	360
gagaatcatc atagcaaact tcacagtttg atcaaggatc ctgccttcaa tatctggcca	420
actgatgtgt aaaagcagct gcaagaactt cagagctgac aaaaaaagca aactccagac	480
tttatttcct ggaatctgtt ttgtgagaca ctggcccatg aaatgctctc ccagaaatag	540
tcggatttgt ggtcaaataa atttgggcaa ttctacagaa catgtgtctt tttcagagat	600
ttatttttta ttaaacttat ttaaaaatat taacatggta caatttgc atagtgaagt	660
gtgcaaactc tcgtacatg gctcaatgag tttttacata tatttccacc catgtaatca	720
ccaccgagat ctagaataga atgtattcgt ctctccagag gttcctctgt tcccttgcag	780
tcaataatte tccaccaaag ataaacattc tgctgacttc cttcatcatt gataagtttt	840
tcctggtttt gaacttcata taaatggaat catttcatgt ctagctcttt tcaactcaaca	900

taacatctgt cagattaata catcgcatgt caatagtttg tagtttttat ggctgtgtag 960  
catttcattc attcattctg ctgttgatgg aaattttcttg actagagttg tgttatcaat 1020  
ttattgcctc ttggctccaa attcaccctt tttgcctggg ctctggaaat gggctctgggc 1080  
cctctaaata ttttcccttt gcaatctggc tcttgaagct tatcagtga gggctcctgga 1140  
ggggcattgc aggggaaaca gtttttccct cctgggttcag ggacgctggg ttggtagccc 1200  
ctgtgggtgt acaggagtac ttggcaagac agcagtttcc ccgggtacac ccgctaggtg 1260  
ttttgtagca gagtgcctct gtgagacaac tggatgaactg ctttccttgc aacctagagg 1320  
gcagatttct ggcaagttcc agagggtgga ttccaaacat gttcctctaa tgtggatctg 1380  
cagtgatgtc tctgccattc agtgggcata gctgtgcctt tttagtgggg tctagatctc 1440  
agccctggga ttgggggcat tttctcagtt gctcaatctc agccctaggg gcagtacca 1500  
ttccttatat atggttggtt gtatattctt tggaactgtc ttgattttat tactgttagt 1560  
ctctcattac tccactccct tattatagta aatgattctt tgtatttgac tttccctggg 1620  
caaggtacta agtgggtttt ctctcctgtt tggatctaga ttgatacaat aattttttgc 1680  
aattatgagc aatgctgctg tgaacattct tgatcatgtc ttagtggaca taagcaataa 1740  
ttgctgctgg gtctgtgtgc aggaatgatt tgctagatca tagcacatac gtttatctgt 1800  
agcagaaact gccaaaggtat atacagcttt ccaaagtgtg ttaatttaca tgctgctag 1860  
caaggtagga gaaatacagt tgcttcccaa gtagctggga ttacaggtgt gtgccaccac 1920  
tcttggttaa tttttttag agatagggtt ttgcatgtt ggccaggcta gtcttgaact 1980  
gctggcctca agtgatctgc ctgccttggg ctcccaaagt gctaggatta cagggatgag 2040  
ccaccatggt cgacttcatg ataaaacttc agtggatgag gagctgcctc ttatgatgaa 2100  
caaagaaggt ggtttcttga aatggaatct actcctggg aagatgctgt gaacattgtt 2160

gaaatgacaa gaaagaattt acagtgttac atagagttag ttgatgaagc agtagcagga 2220  
 ttcgagagga tcgattccaa ttccaaaata agttcttctg tgggtaaaat gctatcaaat 2280  
 ggcgtcgcat gctacagaga aatctatcat gaaaggaaga gtcaattgat gtggcaaaact 2340  
 tcattgttgt cgtattttta gaaattgtca ggaccacccc aaccttcaac aaccatgacc 2400  
 ctgatcagtc aggagccatc cacattgagg cgagaacctc cagcagtaaa aagattatga 2460  
 ttctctaaag gatcagatga acattagcat ttttttaagc aataaagtat ttttacgtaa 2520  
 gatatgtatg ttatttttta ggcataatgc tattatgcat ttaatagact ccagtatatt 2580  
 gtaaacataa ctttaaagtc actgggagat aaaagtattt gctcttttat gatatttgct 2640  
 ttattgcagt agtctgtaat ggaaactaca ttatctcttg ggtacacctg tatacagaaa 2700  
 gaaatttatc atgaggaaat gctcatgcaa tgatggaggc tggaaagtcc caagatctgc 2760  
 agtcagcaag ttggagaccc atgagagtcg atgggtgtggc cccagtctgt gtttgaaggc 2820  
 ctgagaacca ggagagccaa aagctggcaa gctctggacc caggaagagc tgatgtttca 2880  
 gttcaagtcc gaaggcagga aaagactgaa ggcccagctc caggcagtca ggcaggagaa 2940  
 ctttcctttt actcacgaga gggtcagcat ttgtttctgt tcaggctgtc aactgagtga 3000  
 cccagaaaag ctggcacata acattcacca tcgtgctgca agagctgcaa aacctctct 3060  
 gtttctaaca ctgatgctca gccacctcc agtgggcagg gagctgggtg ccgggaggac 3120  
 ttggggttgc cageccagtg tgggcctgga cagttgctga gaatctccct ccgccctgtg 3180  
 acttcttaat tacttagagg gtcacctgg ttgctcactt cagctcactt gggagattct 3240  
 ctctgcttga ggccaggggt aggtccaggt ctgatgggt ctgaagctta tacaattggg 3300  
 gtggggggca ttctctttta aggaaaagaa aacagcagag gtgagtcgtc ctgcagctta 3360  
 gcttcactag tctcgtggaa aatttgcctc ctaaaatgtc tttctctga gaaagcccag 3420  
 gcctccaaag gccagccag gctggcgtca gtctggggtc agctgcgggg aggcctccagg 3480

ccatgtgtga cacgggagtt taccccatcc cagtttccag tggagaagca tcgttctcgt 3540  
ccacccccgt catgctcttt tccaccttct ccagggaag ggatattttc agtctgtaca 3600  
acgaatccac tgaaatgtta aggtgggcac agtggctctgg ggtcttcgac cttgtttata 3660  
cgtggcgcct gttactggtc gggctctgtac aggcagtttc cactggcggt ttttaccagg 3720  
ccagcctaga gtagaatgac cgcagtgtta aatatagatt cctgggcccc agacctgcca 3780  
gaatctctgt gagatggaac ctttcaacct gggttttaaa caagcctccc gggtgattct 3840  
gacactcact ggatttgaga accgtggggg ttgtcagaca gcaggacgt tgatgttggt 3900  
ccttctgcgt tctggtgat gctgttctgt tctcccaagg cctatgcggt ggtgagaatc 3960  
tccaaggata caagacagt atctggagcg agtgtctga aagcagactc tagcactcag 4020  
gactgccaac accctccccg ggtttccttg gtctggaatt cccatcccct ggttccacct 4080  
gttacatcac acctccctt caaggaccag tgcagatgcc acgtccttca cggggctcag 4140  
aatgctcacc agtttctct ccaccgagg ccacagcccc tggagacccc ttgagctgag 4200  
tgctttgtcc ttgcatactc tttctggcct catagtgggg cttggccatt gtcccttcac 4260  
tccagatctc tcctttcagg tccaggaagt gcattctgaa ctttaactttc cagaccccc 4320  
cttcagtttt ccagtcctta gagagggtga cttctgattc ctttgtctct gtgccctgta 4380  
gcctcaggtc aggccttaagg caaggtctcc tcacctggcc tggggagagt cccaggacgc 4440  
tgcacgtgcc tgtgcgggta ggatgctgat gccagattt cccgttagag agcctttccc 4500  
tactctgacg gctctagctt tgtgtgttac ttacttggtc cactttaatt caaaatgtac 4560  
ccagcaacca gcttgtgcac agttctcttg ggtttcagga gggatgtaag acataccct 4620  
tgcccttcag gcactatggc cagaaggggg gcagtgcct aggcagagg cgaggaccag 4680  
cagatgggat aactcagag gagcctgcag caggcagagg cagaggagaa gggaggtcta 4740

cacgttctgc actgtattta tctccttcag ttccaagggt ctctcctggc atctatatgtg 4800  
ctcatgagtt acagagcaaa gcctgggtgtg atggttactt ttaggtgtca acttggctgg 4860  
attaataaat acctagagaa ctggtaaagc attatttctg ggtgtgtttg tgaagggtgtt 4920  
tccagaggag attggctgtg agtcagtggg ctgagtgggg aggagctgcc ctccatgtgg 4980  
gcaggcacca tccattgact gggcccagat agaacaagaa ggcagaagaa atgtgaattc 5040  
ctctttctct gctggagctg ggatattctt cttctcctgc ctttggacat cagagctgca 5100  
ggctctctgg cttttggacc cgaggattta taccaagcag gtttctgggt tctcaggcct 5160  
ttggccttgg actgatagtt acaccattgg catactgtgt tctgaggctc ttggtcttgg 5220  
actgagccac actcctggca tcccagcgtc tccagcttgc atggcctgtc acggtatttc 5280  
ccaacctcgg taatcacgct agccaattct tctaagaaat ttcttctcat ctatctgtct 5340  
gtctatctat ctatctgtct acctaccgac ttacctacct acctgcctat ctatcttttg 5400  
attaatctac ctatcaatct ttctatctat ccataacctg ttgattcgat ctctctagag 5460  
aaccctgact aatacacctg gagtgcagaa tctgctggag aaactgccat tccgttattg 5520  
actggctgggt caggccatac agcctgggtg tctagatgtg tttggaggta gggcttctgt 5580  
agcacagata gtgcctgttc atggctctgt cccaggtaag gcagagctag cttgtgctga 5640  
gggcttctgc tttgcagctg gcctgggggtg gctaggatct ggggacacag gctgcccttt 5700  
ccaggctctg tctgtgtgtg ctgcagggtc ccctacctcc tcttcagtg gaaggctggc 5760  
ccccaggctc tctttaggcc caatacagac tcagccaaag atgcagatgt ctcatatatg 5820  
aggattctga gctgtgactt ctgggtggtta ctccacttta ggcaggaaaa atgttcaact 5880  
gccccatgaaa acaaatgacc ccgggtcatt tgggttttggc acctgctctg ccagttgggt 5940  
ttggcacctg ctctgcctcc tgggaaacag tttggccaat gcaactgcatg aggtgagcgc 6000  
ccatccctgg gaatttagag ccctgtgaag ggtcctgagg agaggcacat cagagagaat 6060

gagaatttaa ggtttactgt taaagcaacc catagaaaag gagcagaatt attcaagcaa 6120  
ggaacaaaag tagaaaaata tcttctttcc cttgcacttg gtttttatgt ttctctctaa 6180  
aatgtattgt gggggagaaa gcagtccccc aaccccccta atcagctgca tatcttagcc 6240  
atgcaaataa ataataaaag agagaaagaa ggagagaaaag agaaagaaaa gtaaaggaag 6300  
gaaggagaga aggaaggaaa gaaagaaaag aaagaaagaa actttgcagc atcctggagc 6360  
accagttcag acaagttctg gtctcctgct tgccttctgc tgtgatttct ctgaagttgc 6420  
tgggggcagg agctgggcag gaactcccca ggggtgccaa gcagagcagg tagttggcta 6480  
agtttgctc caggaaagaa gtccctggag agcgagctgg ttctagaaaag ctccattatt 6540  
atatcctat tgcttttggc gaatatatgt agaacagaat ttgacaatg aaattttcag 6600  
gtgtctttt ggccatcaaa ataaccagct cttggctggg cacagtggct tgccttgta 6660  
attccagtgt tttgggaggc caaggcaggg gactgcgtga gccaggagt ttgagactag 6720  
cctgggcaac atagtgaac cccatctcta caaaaaatac aaagttagaa gagtatgtg 6780  
gcatgcgcct gtggtcacag ctacttgga agctgtgacc caagtcacag gaggatcgt 6840  
tgagcccagg agttcagggc tgtagtgagc tatgattgtg ctactgtgct ccagcctggg 6900  
agacagagt acatcaggtc tctgaaatat taaaattaaa aagcccaaac caactctgct 6960  
tttactctt tcagtttcat ttcttctgt cctctctgct ctctcacca gggtaacatt 7020  
tttaaagtgc cgctattgtg ttaagaattg gatttattct ctgtgttaaa ttctctcagc 7080  
attaactaca gactctgtta tgtaaataag gtaaattatc aggatgagaa gtgagactct 7140  
aatttatgag tttatcatgt ctctttaaaa agctgctagg tgctatccta acttattagg 7200  
cttgaaggat tctgggggat tggcatattg ttactgttgt ggactttgtt tgccttgatc 7260  
ataccattt tacagatgag aaaagtgagg ctgggattgg ggctcaaatg cgtgctcaga 7320



gtcacataag taggttggaa ggtgacgcta cagacacggt aaattgtgaa ggcctgctgg 7380  
taaggcacga gtgatttgaa tgacactctt tttttttttt tcttagtgat tctgtgcaga 7440  
atcaccattt ttggtaaaca aaccaagccc agaacctgat aattatggag cattctacac 7500  
tgacagttct ttgagacaaa tttcctcttg gcatttacac tgtggcttta gctttcaaac 7560  
cagaggttcc tcttaccag caaaaagtga gttatacgtt ttcttaatgt tataacgtta 7620  
ccatggatga tctgaactt gccgaggata gcagagacgg gtgggcagaa caggaaagaa 7680  
tcagatcaga gactgtaaaa agtaacttaa aaaaaataa ttctggcaga gacagaattt 7740  
gaaggtactt gtgcacatca gaacactgga cttgcttttt tctgggagca ggaatgctgc 7800  
ttaattagat cagagaagaa tgcaagtggc ccatacattt agatctacaa tgcgtggttt 7860  
ccagacctgc agcttgtttt gctgcgcttc atcatggagt catagaaggg cagagctgga 7920  
ggaccgagtg aggacactgg tgccatatcc ctacagacag gcaattggag actcccgtag 7980  
gttaagggtc gcagagcctg gaccaatgcc cagaatctct gagcttttta tcttacacca 8040  
tgaagtgaca gatgctggca gatgttagac ctttgtgctt aactgtttta ccacacagca 8100  
ccgacttct gtatgcagcg aggttctaga gtttccaaaa cacgggtctc ctctcccacc 8160  
tcagcctct agcataaaac tagacacatc ctcatgcttt tgaggtctaa tcatggatt 8220  
ttgttccttt cagatggctt tcccgaagat gagattgatg tatatttgcc ttctggttct 8280  
gggggctctt tgtttgatt ttageatgta cagtctaat ctttcaaag aacagtcctt 8340  
tgtttacaag aaagacggga acttccttaa gctcccagat acagactgca ggcagacacc 8400  
tcccttctc gtcctgctgg tgacctcatc ccacaaacag ttggctgagc gcatggccat 8460  
ccggcagacg tgggggaaag agaggatggg gaagggaaag cagctgaaga cattcttct 8520  
cctggggacc accagcagt cagcggaaac gaaagagggt gaccaggaga gccagcgaca 8580  
cggggacatt atccagaagg atttctaga cgtctattac aatctgacce tgaagaccat 8640

gatgggcata gaatgggtcc atcgcttttg tcttcaggcg gcgtttgtga tgaaaacaga 8700  
ctcagacatg ttcataatg ttgactatct gactgaactg cttctgaaga aaaacagaac 8760  
aaccaggttt ttcactggct tcttgaaact caatgagttt cccatcagge agccattcag 8820  
caagtggttt gtcagtaaat ctgaatatcc gtgggacagg taccaccat tctgctcgg 8880  
caccggctac gtgttttctg gcgacgtggc gagtcagggtg tacaatgtct ccaagagcgt 8940  
cccatacatt aaactggaag acgtgtttgt ggggctctgc ctgaaagge tgaacatcag 9000  
attggaggag ctccactccc agccgacctt ttttcagggtt ggcttacgt tctccgtatg 9060  
cctcttcagg aggatcgtgg cctgccactt catcaagcct cggactctct tggactactg 9120  
gcaggctcta gagaattccc ggggggaaga ttgtccgcct gtctgagggg agcccagagg 9180  
cacatccgga caagtttcag ataaccgtg gggatagttt ttgctagatt ttggaagagg 9240  
gggcgggaca gaggatgctg ttcttcagtg ctgaaatcca cggcagaatg tgggtgttca 9300  
tgaagtcact gattagtcc cacttggtgc cccaggcaat aataggcccg tctcttgggc 9360  
acgcacactc ttcatactaa gtgtttgaca tacacctgga tttttgcatt tcaggggtca 9420  
gtatcctatg acatgatggg tgttaccatc ctaattttac aggcaaggac acagcagctg 9480  
cgagaggtag agaaacttgt cccaaggctc acagccagta ggcataggag cgggaatgaa 9540  
aatcgagcac tgcagaatc tgggtgggcag cccctgactt gaaccactcc cagtgctgc 9600  
ctcccttagg aggggacact gatgatgagg tctcggagcc ggcacacctc catccctgtc 9660  
gagtcacctc cactcagct cccagtcctt gtgttttttg gagctaagcc tgggatgacc 9720  
aaattcaccc cagtccttc attcacagggt ctggatgtag ctgggattga gtccatgtta 9780  
tcggctcgggt actcaacaca acccaagttt catccgagga aatgtcccg cagtggatgc 9840  
agctcacatg ctgaggaaca cccagctctg gacagagttc ttataaatgt ataaattagg 9900

ctcagaaacc actgcattct gacctgctgt acagactgcc cacactgctg acctgcctag 9960  
cgagcaggac atcccttctg agccatctgc tgcctctctca tttcatcacc ccaactgtcc 10020  
cttgtttttg atcaatgggg accagccact gccccaggag cacttttaggg ctctcagttc 10080  
aaactgaagg acagttgaac tcagatgggg ttcattgtggg attctgggag ctttctggga 10140  
attcagttgg agtcaagtca ggatgctctc aaggaccctt cgggctcaga gccctaaagt 10200  
gggccttggg gaagcagggt ggtcctgcgt ccacttccca agcctgagcc aagctcatct 10260  
tcattgaatg tctcatttgg ccgaggaaca actgaacttt gtggtttgct gtttagcctt 10320  
cagtttgctc cgctgcctcc taccagagg tttgtgcgag cctgtgttgc agggttgtat 10380  
aaaaccaagg tacttcgtta gttttgccc ttcagccatg gtcacgtgac atgcaaagta 10440  
atcttgctcc taattataga aatgattttt cttttaattt tttactttac cagactttac 10500  
tttgtactca gagaagaggc ctcacatggc tgtgtcacat ataaatgttg gactaaactc 10560  
tt 10562

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

ttcagccacc taacagttgc cagg

24

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5

ataccttctt cgtggcttgg tggag

25

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6

tagaagctag aagagctatt cggc

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7

actcgccagt gattgaacac aaac

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8

cccaatgcca agtacgtaat gaag

24

<210> 9  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9  
tgtggtgttc cttagcatga cctg 24

<210> 10  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10  
ttgatcccca accaggaagc ttgc 24

<210> 11  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 11  
tgaggccact gctcctctga tacg 24

<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 12

gatatcgccg cgctcgtcgt cgac

24

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 13

caggaaggaa ggctggaaga gtgc

24

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 14

ctttagagca c

11

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 15

ctctaaag

8

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified\_base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (9)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (15)

<223> i

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 16

gcnathmgnc aracntgggg

20

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified\_base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (15)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (21)

<223> i

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 17

taygtnatga aracngaytc ngay

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified\_base

<222> (10)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (19)

<223> i

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 18

rterctrten gtyttcatna crta

24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> modified\_base

<222> (4)

<223> i

<220>

<221> modified\_base



<222> (7)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (10)

<223> i

<220>

<221> modified\_base

<222> (16)

<223> i

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 19

rcanarnccn acrtanacrt cytc

24

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 20

accaccagca gtgcagcgga aac

23

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 21

gccacgatcc tctgaagag gca

23

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 22

ctaagcttga aaggatttag actgtacatg c

31

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 23

ctaagcttgt ctgcctgcag tctgtatctg g

31

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 24

ctaagcttga caggccatgc aagctggag

29

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 25

ctaagcttgt gaattcctct ttctctgctg

30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01070

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/54, C12P21/02, C12N9/10, C12N1/21, C12N5/14, C12N5/16,  
C12Q1/68, C12N15/63, A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/574, A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/54, C12P21/02, C12N9/10, C12N1/21, C12N5/14, C12N5/16,  
C12Q1/68, C12N15/63, A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/574, A01H5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	ZHOU, D. et al, "Molecular cloning of a human UDP-galactose: GlcNAc $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1,3 galactosyltransferase gene encoding an O-linked core3-elongation enzyme", Eur.J.Biochem., (July, 1999) Vol.263, No.2 p.571-576	1-47
P, X	ISSHIKI, S. et al, "Cloning, expression, and characterization of a novel UDP-galactose: $\beta$ -N-acetylglucosamine $\beta$ 1,3-galactosyltransferase ( $\beta$ 3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom", J.Biol.Chem., (April, 1999) Vol.274, No.18 p.12499-12507	1-47
P, X	BARDONI, A. et al, "Differential expression of $\beta$ 1,3 galactosyltransferases in human colon cells derived from adenocarcinomas or normal mucosa", FEBS Letters, (May, 1999) Vol.451, No.1, p.75-80	1-47
P, X	JP, 11-56373, A (Koichi HURUKAWA), 02 March, 1999 (02.03.99), (Family: none)	1-47



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 May, 2000 (23.05.00)

Date of mailing of the international search report  
30.05.00

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01070

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHOU, D. et al, "A $\beta$ -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase with poly-N-acetyllactosamine synthase activity is structurally related to $\beta$ -1,3-galactosyltransferases", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (Jan., 1999) Vol. 96, No. 2 p. 406-411	1-47
X	AMADO, M. et al, "A family of human $\beta$ 3-galactosyltransferases", J. Biol. Chem., (1998) Vol. 273, No. 21, p. 12770-12778	1-47
X	HENNET, T. et al, "Genomic cloning and expression of three murine UDP-galactose : $\beta$ -N-acetylglucosamine $\beta$ 1,3-galacto-syltransferase genes", J. Biol. Chem., (1998) Vol. 273, No. 1, p. 58-65	1-47
X	JP, 6-181759, A (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 05 July, 1994 (05.07.94), (Family: none)	1-47

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> C12N15/54, C12P21/02, C12N9/10, C12N1/21, C12N5/14, C12N5/16, C12Q1/68, C12N15/63, A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/574, A01H5/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> C12N15/54, C12P21/02, C12N9/10, C12N1/21, C12N5/14, C12N5/16, C12Q1/68, C12N15/63, A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/574, A01H5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	ZHOU, D. et al, "Molecular cloning of a human UDP-galactose: GlcNAc $\beta$ 1, 3GalNAc $\beta$ 1, 3 galactosyltransferase gene encoding an O-linked core3-elongation enzyme", Eur. J. Biochem., (July, 1999) Vol. 263, No. 2 p. 571-576	1-47
P, X	ISSHIKI, S. et al, "Cloning, expression, and characterization of a novel UDP-galactose: $\beta$ -N-acetylglucosamine $\beta$ 1, 3-galactosyltransferase ( $\beta$ 3Gal-T5) responsible for synthesis of type 1 chain in colorectal and pancreatic epithelia and tumor cells derived therefrom",	1-47

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.05.00

国際調査報告の発送日

30.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	J. Biol. Chem., (April, 1999) Vol. 274, No. 18 p. 12499-12507	
P, X	BARDONI, A. et al, "Differential expression of $\beta$ 1,3 galactosyltransferases in human colon cells derived from adenocarcinomas or normal mucosa", FEBS Letters, (May, 1999) Vol. 451, No. 1, p. 75-80	1-47
P, X	JP, 11-56373, A (古川鋼一) 2. 3月. 1999 (02. 03. 99) パテントファミリー無し	1-47
X	ZHOU, D. et al, "A $\beta$ -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase with poly-N-acetyllactosamine synthase activity is structurally related to $\beta$ -1,3- galactosyltransferases", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (Jan., 1999) Vol. 96, No. 2 p. 406-411	1-47
X	AMADO, M. et al, "A family of human $\beta$ 3-galactosyltransferases", J. Biol. Chem., (1998) Vol. 273, No. 21, p. 12770-12778	1-47
X	HENNET, T. et al, "Genomic cloning and expression of three murine UDP-galactose: $\beta$ -N-acetylglucosamine $\beta$ 1,3-galactosyltransferase genes", J. Biol. Chem., (1998) Vol. 273, No. 1, p. 58-65	1-47
X	JP, 6-181759, A (協和醗酵工業株式会社) 5. 7月. 1994 (05. 07. 94) パテントファミリー無し	1-47